



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 37 391 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/00
C 12 N 5/12
G 01 N 33/573
G 01 N 33/577
// C12Q 1/32

⑲ Aktenzeichen: 198 37 391.0
⑳ Anmeldetag: 18. 8. 98
㉑ Offenlegungstag: 25. 2. 99

DE 198 37 391 A 1

③0 Unionspriorität:
97 114630 22. 08. 97 EP

⑦1 Anmelder:
F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH

⑦4 Vertreter:
Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

⑦2 Erfinder:
Yoshikubo, Takashi, Yokohama, Kanagawa, JP;
Hasegawa, Masami, Yokohama, Kanagawa, JP

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤4 Immunologische Materialien und Verfahren zum Nachweis von Dihydropyrimidindehydrogenase
⑤7 Es werden immunologische Materialien, insbesondere monoklonale Antikörper, die spezifisch Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) erkennen, Hybridomazelllinien, die diese Antikörper produzieren, und Verfahren zum Nachweis von Dihydropyrimidindehydrogenase unter Verwendung dieser Antikörper beschrieben.

DE 198 37 391 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft immunologische Materialien und Methoden, die zur Bestimmung von Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) in biologischen Proben geeignet sind.

- 5 Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) ist bekannt als ein Enzym, das die Reduktion von Pyrimidinen zu 5,6-Dihydropyrimidinen katalysiert, wobei die entstehenden Kataboliten, Dihydrouracil und Dihydrothymine weiter zu β -Alanin bzw. β -Aminoisobuttersäure katabolisiert werden.

- Es ist auch bekannt, daß DPD die reduzierenden Reaktionen von 5-Fluoruracil (5-FU) und von verschiedenen Kataboliten von Pyrimidinanaloga und Derivaten katalysiert, die weithin als Antitumorarzneimittel verwendet werden, z. B. 2'-Desoxy-5-fluoruridin (2'-dFUrd), 5'-Desoxy-5-fluoruridin (5'dFUrd, Doxifluoridin) und dgl. Es wurde berichtet, daß der DPD-Pegel in biologischen Proben von einzelnen Personen, die an einem Tumor leiden, ein interessanter Marker für die therapeutische Wirksamkeit von Antitumorarzneimitteln in der Reihe der 5-Fluoruracilderivate ist (siehe z. B. Iigo et al., 1969, Biochem. Pharmacol., 38, 1885 bis 1889).

- Es ist bekannt, daß ein Mangel an DPD für die Toxizität der Metaboliten von Pyrimidin-Antitumorarzneimitteln verantwortlich ist, was während der Chemotherapie zu einem lebensbedrohenden Zustand führt (G. Milano und Etienne, 1988, M.C., Pharmacogenetics, 4, 301 bis 306). Kürzlich wurde gefunden, daß die Störung des DPD-Mangels häufiger vorkommt, als ursprünglich gedacht (Diasio und Lu, 1994, J. Clin. Oncol., 12, 2239 bis 2242). Es ist daher wichtig, Patienten mit DPD-Mangel zu finden.

- Es besteht daher ein Bedarf für einen empfindlichen und zuverlässigen Test zur Bestimmung des DPD-Gehaltes in biologischen Proben.

- Verschiedene Methoden für solche Tests wurden beschrieben. Fernandez-Salguero et al. berichteten über ein Dünnschichtchromatographie-(DC)-Verfahren zur Bestimmung der DPD-Aktivität bei menschlichen peripheren Lymphozyten (Fernandez-Salguero et al., 1995, Biochem. Pharm. 50, 1015 bis 1020). Bei dem Test wird radioaktiv markiertes Uracil als Substrat verwendet. Jedoch ist eine Methode, bei der eine radioaktive Markierung verwendet wird, offensichtlich nicht für eine Routinediagnose in Krankenhäusern geeignet. Außerdem ist ein solches DC-Verfahren zeitaufwendig.

- Andere Testmethoden unter Verwendung von HPLC wurden auch beschrieben, z. B. von van Gennip et al., 1982, Adv. Exp. Med. Biol., 253A: 111 bis 118 und Sommadossi et al., 1982, J. Biol. Chem., 257: 8171 bis 8176. Diese Methoden basieren auf der Messung der Enzymaktivität durch Bestimmung der Summe verschiedener Kataboliten von 5-FU unter Verwendung von Reverse-Phase-HPLC. Solche Methoden sind kompliziert und zeitaufwendig.

- Das von der vorliegenden Erfindung gelöste Problem besteht darin, Materialien und Methoden zu finden zur Bestimmung des DPD-Gehaltes, die nicht die Nachteile der obigen bekannten Methoden haben, insbesondere solche, die einen einfachen und schnellen Test zur routinemäßigen Verwendung in Krankenhäusern liefern.

Das obige Problem wird erfindungsgemäß gelöst, wie in den beigefügten Ansprüchen definiert.

- Die vorliegende Erfindung liefert einen monoklonalen Antikörper, der spezifisch dafür ist, Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD), insbesondere menschliche Dihydropyrimidindehydrogenase, zu erkennen.

Der obige monoklonale Antikörper ist geeigneterweise ein monoklonaler Antikörper, der eine starke Reaktivität für ein Homogenisat aus der Humantumorzelllinie HT-3 (ATCC HTB-32) zeigt, aber nur eine geringe Reaktivität oder keine Reaktivität für ein Homogenisat aus der Humantumorzelllinie MCF-F (ATCC HTB-22).

Der obige monoklonale Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper, der eine hohe Spezifität für DPD zeigt.

- Geeigneterweise zeigt das Immunpräzipitat, das mit einem Homogenisat aus der Humantumorzelllinie HT-3 (ATCC HTB-32) erhalten wird, eine einzige Bande, wenn es mit SDS-PAGE analysiert wird.

- Der monoklonale Antikörper kann geeigneterweise von einer Hybridomazelllinie erzeugt werden, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Hybridomazelllinien 2B6-11-1, 9C7-30-1, 5E6-19-1, 3A5-6-1 (FERM BP-6015), 6H5-42-1, 4B9-12-1 (FERM BP-6016), 2E2-B3-1-3 (FERM BP-6014) und 3B12-B1-56-1-2. Bevorzugt ist der monoklonale Antikörper ein solcher, der von einer Hybridomazelllinie erzeugt wird ausgewählt aus 3A5-6-1 (FERM BP-6015), 4B9-12-1 (FERM BP-6016), 2E2-B3-1-3 (FERM BP-6014).

- Der monoklonale Antikörper kann auch irgendein monoklonaler Antikörper sein, der DPD in äquivalenter Weise bindet, wie von den obigen Zelllinien erzeugter monoklonaler Antikörper, d. h. ein monoklonaler Antikörper, der an das gleiche Epitop bindet, wie der von einer der obigen Zelllinien erzeugte monoklonale Antikörper oder stark mit einem monoklonalen Antikörper, der von einer der obigen Zelllinien erzeugt wurde, kreuzreagiert.

Die Erfindung betrifft auch eine Hybridomazelllinie, die den oben definierten monoklonalen Antikörper erzeugt.

Diese Hybridomazelllinie wird geeigneterweise ausgewählt aus der obigen ersten Gruppe von spezifischen Hybridomazelllinien und bevorzugt aus der obigen zweiten Gruppe von spezifischen Hybridomazelllinien.

- Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Paar von monoklonalen Antikörpern, das zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung von DPD geeignet ist, wobei das Paar einen ersten monoklonalen Antikörper, der spezifisch Dihydropyrimidindehydrogenase erkennt, und einen zweiten monoklonalen Antikörper, der spezifisch Dihydropyrimidindehydrogenase erkennt, umfaßt, wobei der erste monoklonale Antikörper und der zweite monoklonale Antikörper verschiedene Epitope erkennen.

- Ein solches Paar von monoklonalen Antikörpern kann als ersten monoklonalen Antikörper einen monoklonalen Antikörper ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Mab-3A5-6-1, Mab-6H5-42-1 und Mab-3B12-B1-56-1-2 und als zweiten monoklonalen Antikörper einen monoklonalen Antikörper ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Mab-4B9-12-1, Mab-2E2-B3-1-3, Mab-9C7, Mab-2B6 und Mab-5E6-19-1 aufweisen.

Bevorzugt ist der erste monoklonale Antikörper Mab-3A5-6-1 und der zweite monoklonale Antikörper ist Mab-4B9-12-1 oder Mab-2E2-B3-1-3.

- Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung einen Kit zum Nachweis und/oder zur Bestimmung der Menge von Dihydropyrimidindehydrogenase in einer biologischen Probe, der umfaßt

- (a) mindestens einen monoklonalen Antikörper, wie oben definiert und

(b) eine Markierung, um das Immunokonjugat aus monoklonalem Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase qualitativ und/oder quantitativ nachzuweisen.

Bevorzugt umfaßt der Kit ein Paar von monoklonalen Antikörpern und eine Markierung, wie oben definiert.
In einer anderen Hinsicht betrifft die Erfindung einen Immunoassay zum Nachweis und/oder zur Bestimmung der Menge an Dihydropyrimidindehydrogenase in einer biologischen Probe, der umfaßt, daß man

- (a) die Probe mit mindestens einem monoklonalen Antikörper, wie oben definiert, behandelt, um ein Immunokonjugat von Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase zu erzeugen und
- (b) dieses Immunokonjugat mit Hilfe einer Markierung qualitativ oder quantitativ nachweist.

Der Immunoassay kann irgendeine Art von Immunoassay sein, der auf dem Gebiet der Immunoassays bekannt ist (siehe z. B. M. Ferencik, 1993, in "Handbook of immunochemistry", veröffentlicht von Chapman & Hall, London, UK). Insbesondere kann er ein Ein-Punkt-Binde-Assay sein, z. B. ein Immunpräzipitationsverfahren oder ein Zwei-Punkt-Bindungs-Assay (Sandwich-Assay), z. B. ein ELISA. Ein Zwei-Punkt-Bindungs-Assay verwendet bevorzugt ein Paar von monoklonalen Antikörpern, wie oben definiert.

Herstellung der monoklonalen Antikörper

Die zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern für ein spezifisches Antigen verwendete Methodik ist im Stand der Technik wohl bekannt und wird z. B. von Harlow et al., 1988, in Abschnitt 6 von "Antibodies: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, New York, USA, beschrieben.

Hybridomazelllinien, die monoklonale Antikörper erzeugen, die spezifisch DPD erkennen, werden zuerst hergestellt. Für diesen Zweck wird ein Versuchstier mit dem DPD-Protein oder Fragmenten davon als Antigen immunisiert. Das Versuchstier kann von irgendeiner Art sein, die immunkompetente Zellen besitzt, z. B. Lymphozyten und Milzzellen, die zur Herstellung einer Hybridomazelllinie geeignet sind. Geeignete Arten sind z. B. Maus, Ratte, Kaninchen und Ziege. Die Arten Maus oder Ratte sind besonders geeignet. Das Antigen kann das DPD-Protein selbst sein oder es können Fragmente davon sein, einschließlich einer Mischung solcher Fragmente. Das DPD-Protein oder Fragmente davon, die als Antigene verwendet werden, können entweder erhalten werden, indem das Protein aus einer natürlichen Quelle isoliert wird oder indem es mit Hilfe von Gentechnik produziert wird. Das DPD-Protein kann aus natürlichen Quellen erhalten werden, z. B. Lebergewebe, bevorzugt von einem Menschen, mit dem Isolierungsverfahren, das bereits angegeben wurde, z. B. von Lu et al. in J. Biol. Chem. 267, 17102 bis 17105, 1992.

Die Gentechnik liefert ein geeignetes Mittel zur Herstellung rekombinanter Gene. Die Information über die Nucleotidsequenz von menschlichem DPD ist erhältlich bei der Gen-Bank™/EMBL Datenbank mit der Zugangsnummer U09179 (siehe H. Yokota et al., 1994, J. Biol. Chem. 269, Seiten 23192 bis 23196). Die Nucleotidsequenz von menschlichem DPD und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind in der unten angegebenen Sequenzbeschreibung als SEQ ID Nr. 1 bzw. SEQ ID Nr. 2 angegeben. Auf Basis dieser Sequenzinformation kann ein rekombinantes DPD-Protein oder ein Fragment davon erzeugt werden entweder unter Verwendung einer synthetischen DNA oder eines klonierten DPD-Gens mit Hilfe von üblichen Expressionssystemen für rekombinante Gene. Wenn eine Klonierung erwünscht ist, kann die Klonierungsstrategie auf irgendeiner Nucleinsäureamplifikationsmethode basieren, z. B. unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der Ligase-Kettenreaktion (LCR), einer Transkriptionsamplifikation oder einer sich selbst erhaltenden Sequenzreplikation. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist besonders zuverlässig und geeignet. Die PCR-Klonierungsstrategie kann die volle Nucleotidsequenz des DPD-Gens oder die Teilnucleotidsequenz des Gens liefern. Es wird in den Beispielen gezeigt, daß ein Fragment von DPD in Form eines Fusionsproteins mit GST-Protein ein wirksames Antigen zur Immunisierung eines Tieres ist.

Die in SEQ ID Nr. 2 beschriebene Aminosäuresequenz liefert nützliche Informationen für die chemische Synthese von DPD-Fragmenten. Solche synthetischen Peptide sind auch als Antigen für die vorliegende Erfindung geeignet. Die Antigenizität der Antigene, die mit einer der obigen Methoden hergestellt wurden, kann mit Western-Blotting abgeschätzt werden.

Durch Injektion dieses Antigens in eine Maus, eine Ratte, ein Schaf, Kaninchen oder dgl., können monoklonale Antikörper der vorliegenden Erfindung hergestellt werden, indem Antikörper produzierende Zellen aus einem solchen immunisierten Tier gewonnen werden und die Zellen immortalisiert werden. Die Immunisierung der Tiere mit dem obigen Antigen kann mit im Stand der Technik wohl bekannten Verfahren durchgeführt werden, wie sie z. B. in der obigen Literaturstelle Harlow et al. beschrieben wurden. Die Immortalisierung liefert Hybridomazelllinien, die monoklonale Antikörper erzeugen, und sie kann in üblicher Weise durchgeführt werden, z. B. durch Fusion der obigen Zellen mit Myelomazellen oder Mausmyelomazellen.

Der Kulturüberstand solcher Hybridomas wird auf monoklonale Antikörper gescreent mit üblichen Verfahren wie Dot-Immunoassays, z. B. Western-Blotting oder Radioimmunoassays, Enzymimmunoassays oder dgl.

Monoklonale Antikörper können aus Hybridomaüberständen mit üblichen chromatographischen Verfahren, z. B. Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie auf Protein G oder Protein A, HPLC oder dgl. gereinigt werden.

Für die Herstellung großer Mengen von monoklonalen Antikörpern gemäß im Stand der Technik bekannten Methoden können Hybridomas, die den gewünschten Antikörper sezernieren, intraperitoneal in Mäuse injiziert werden, die mit Pristan vor der Injektion vorbehandelt wurden. Bis zu ungefähr 100 mg eines monoklonalen Antikörpers können von solchen Ascites-Tumoren in einer Maus erzeugt werden. Monoklonale Antikörper können z. B. aus Ascitesflüssigkeit gereinigt werden, die von solchen Tumoren erzeugt wird, wie in Beispiel 2 beschrieben.

Monoklonale Antikörper können nach ihrer Unterklasse mit bekannten Methoden, z. B. der Ouchterlony-Immunodiffusion, oder unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Testkits, z. B. Maus-Mono-Ab-ID EIA-Kit (Zymed, San

Francisco, CA, USA) gekennzeichnet werden. Bei der vorliegenden Erfindung wird die Unterklasse der jeweiligen monoklonalen Antikörper aus den Hybridomazelllinien, die in Beispiel 2 hergestellt wurden, bestimmt mit Mab-2B6-11-1 (IgG1, κ), Mab-9C7-30-1 (IgG1, κ), Mab-5E6-19-1 (IgG3, κ), Mab-3A5-6-1 (IgM, κ), Mab-6H5-42-1 (IgM, κ).

Die erfindungsgemäßen Hybridomazelllinien, die als 4B9-12-1, 3A5-6-1 und 2E2-B3-1-3 bezeichnet werden, sind besonders nützlich zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern der vorliegenden Erfindung, insbesondere für Mehrstellenbindungstests. Solche Zelllinien wurden beim National Institute of Bioscience and Human-Technology (NIBHT) in Japan am 8. Juli 1997 gemäß dem Budapester Vertrag mit den folgenden Hinterlegungsnummern hinterlegt: FERM BP-6014 für 2E2-B3-1-3, FERM BP-6015 für 3A5-6-1 und FERM BP-6016 für 4B9-12-1.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können für die Immunaффinitätsreinigung von DPD verwendet werden. Solche Antikörper können hierzu an feste Träger gebunden werden mit Methoden, die im Stand der Technik wohl bekannt sind, z. B. durch kovalente Bindung an mit CNBr aktivierte Agarose, z. B. Sepharose oder dgl.

Weiterhin können die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung auch als Diagnosemittel zur Bestimmung des DPD-Gehalts in biologischen Proben verwendet werden, die Tumorgewebe von menschlichen Patienten sein können. Für eine solche Verwendung können die monoklonalen Antikörper an einen fluoreszierenden Farbstoff, eine Farbe produzierende Substanz, wie ein Enzym (Enzym-linked Immunosorbent Assay: ELISA) oder eine im Stand der Technik übliche Markierung, wie Biotin, gebunden werden.

Um die Leistung der Assayart, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gestaltet werden kann, untersuchen, kann der folgende übliche Test angewendet werden, bei dem Radioisotope verwendet werden.

20 Methode zum Test der enzymatischen Aktivität von DPD

Die Enzymaktivität von DPD kann bestimmt werden, indem die Summe der 5-FU-Kataboliten gemessen wird, d. h. Dihydrofluoruracil, α -Fluor- β -ureidopropionat und α -Fluor- β -alanin, die aus $[6-^{14}\text{C}]5\text{-FU}$ gebildet werden. Praktisch kann das folgende Verfahren für den obigen Test angewendet werden:

25 Die Standardreaktionsmischung enthält 10 mM Kaliumphosphat (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM Dithiothreitol, 2,5 mM MgCl_2 , 250 μM NADPH, 25 μM $[6-^{14}\text{C}]5\text{-FU}$ (56 mCi/mmol) und 25 μl rohes Enzym (Endproteinkonzentration: 1 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 50 μl . Die Reaktion wird bei 37°C 30 Minuten lang durchgeführt und dann beendet, indem die Reaktionsröhrchen (0,5 ml Eppendorfröhrchen) 30 Minuten lang in ein siedendes Wasserbad eingetaucht werden. Die Reaktionsröhrchen werden bei -20°C mindestens 20 Minuten lang eingefroren, bevor weitere Manipulationen unternommen werden. Die Proteine werden durch Zentrifugation entfernt und dann werden 30 10 μl der Überstandsflüssigkeit auf Silicagel-DC-Platten getupft (MERCK 5735), auf die vorher 5 μl einer Mischung der authentischen Marker getupft wurden mit 10 mM 5-FU, 50 mM Dihydrouracil, 20 mM β -Ureidopropionat, 10 mM α -Fluor- β -alanin und 50 mM Harnstoff. Die Flecken werden in einem Lösungsmittelsystem entwickelt in einer Mischung aus Ethylacetat/Isopropanol/ H_2O (65 : 23 : 12, V/V/V). Diese entwickelten Marker werden mit den Methoden von Nanguib et al., 1985, Cancer Res. 45, 5405, identifiziert. Die Radioaktivität der als 5-FU-Kataboliten identifizierten Flecken kann mit dem BAS-1000-System (Fuji Film) nachgewiesen werden. Die DPD-Aktivität wird ausgedrückt als pmol 5-FU umgewandelt/mg Protein/min.

Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

40 Als typische Anwendung der monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung in quantitativen immunologischen Assays werden eine Ein-Punkt-Bindungsmethode und eine Zwei-Punkt-Bindungsmethode (ein sogenannter Sandwich-Assay) in Betracht gezogen. Es kann allgemein gesagt werden, daß Zwei-Punkt-Bindungsmethoden vorteilhaft sind, da eine höhere Genauigkeit und höhere Empfindlichkeit erreicht wird. Ein ELISA unter Verwendung eines Paares von monoklonalen Antikörpern, wie oben definiert, erwies sich als empfindliche und schnelle Assayart (siehe Beispiel 3).

Der ELISA kann durchgeführt werden, indem einer der Antikörper auf einem festen Träger immobilisiert wird, der so immobilisierte Antikörper dem Kontakt mit einer Probe ausgesetzt wird, von der angenommen wird, daß sie DPD enthält, unter Bildung eines DPD-Antikörper-Konjugats, dieses Konjugat mit dem anderen monoklonalen Antikörper umgesetzt wird, unter Bildung eines sandwichartigen DPD-Konjugats, d. h. Antikörper-DPD-Antikörper, und letzteres Konjugat markiert wird, z. B. mit mit HRP markiertem Ratten-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper, um das Konjugat nachzuweisen. Wenn HRP als Markierung verwendet wird, kann der Nachweis mit einer farbbildenden Reaktion durchgeführt werden, z. B. unter Verwendung des TMB-Mikronapferoxidase-Kit-Systems (KPL), das TMB und H_2O_2 als Substrat enthält, das bei der enzymatischen Reaktion, die durch HRP katalysiert wird, Farbe entwickelt. Als Markierung 55 zum Nachweis kann der Ratten-Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper irgendeine übliche Markierung aufweisen, z. B. Biotin, ein Enzym, ein Radioisotop und dgl. Alternativ kann der monoklonale Antikörper in mobiler Phase mit HRP, Biotin, einem Radioisotop, Latexteilchen und dgl. markiert sein.

Wie in Beispiel 3 gezeigt, kann ein hochempfindlicher ELISA erhalten werden unter Verwendung des oben definierten Paares von monoklonalen Antikörpern. Die hohe Empfindlichkeit macht den Test geeignet zum Nachweis des DPD-Gehaltes in biologischen Proben des menschlichen Körpers, sogar im Fall eines geringen Gehaltes an DPD, wie bei dem oben beschriebenen Zustand des DPD-Mangels.

Immunpräzipitation

65 Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper sind auch geeignet zur Isolierung und Bestimmung von DPD-Proteinen mit einem Immunpräzipitationsverfahren. Die Methodik der Immunpräzipitation selbst ist im Stand der Technik wohl bekannt. Unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers, wie oben definiert, liefert sie die spezifische Abtrennung des Zielantigens (DPD) aus einer komplexen Probe aufgrund der hohen Bindungsspezifität des monoklonalen An-

likörpers.

Eines der typischen Ausfällungsmittel, die verwendet werden können, ist Protein G-Sepharose 4B, wobei Protein G, das mit dem Fc-Bereich von Maus-Immunglobulin binden kann, auf der Oberfläche von Sepharose 4B-Kügelchen immobilisiert wird. Dieses Mittel bildet einen Komplex von DPD-Antikörper-Protein-G-Sepharose-Kügelchen, wenn DPD vorhanden ist, und der Komplex kann durch Zentrifugation abgetrennt werden. Aus dem gesammelten Niederschlag des Komplexes können Antigen (DPD) und Antikörper unter saurer Bedingung dissoziiert werden, z. B. in einem Glycin-HCl-Puffer, pH 3,0. Das so abgetrennte DPD kann leicht von dem Immunglobulin mit Hilfe von Gelfiltration isoliert werden. Ein solcher Komplex, an den DPD gebunden ist, ist nicht nur zur Isolierung dieses Enzyms, sondern auch zur quantitativen Auswertung des Enzyms nützlich. So sind die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung gute Mittel zur Isolierung und Bestimmung von DPD aus komplexen biologischen Proben, wie in Beispiel 6 unten gezeigt.

Antikörper-Einfang-Assay

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper sind auch geeignet in einem Antikörper-Einfang-Assay. Bei dieser Assayart wird der monoklonale Antikörper auf Oberflächen eines geeigneten Behälters immobilisiert, z. B. den Näpfen einer Mikrotiterplatte. Die Immobilisierung erfolgt mit im Stand der Technik üblichen Methoden. Wenn eine Probe, die DPD enthält, solchen Näpfen zugegeben wird, wird das DPD-Peptid von dem immobilisierten monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung eingefangen. Nach dem Waschen der Näpfe wird eine Lösung, die das Substrat von DPD enthält, zugegeben. So liefert das Nachweissystem des enzymatischen Produktes ein Mittel zur Bestimmung der DPD-Aktivität. Diese Assayart ist nützlich, um zu bestimmen, ob das eingefangene DPD eine intakte enzymatische Wirkung hat, da Patienten, die genetische Defekte des DPD-Gens tragen, mutierte DPD-Proteine haben können, denen die enzymatische Aktivität fehlt.

Alternativ wird, nachdem DPD von dem immobilisierten monoklonalen Antikörper eingefangen wurde, der Immunkomplex gewaschen und dann das DPD-Polypeptid mit einer geeigneten Pufferlösung, z. B. unter sauren Bedingungen, eluiert. Diese Manipulation liefert auch ein gereinigtes DPD-Präparat.

Klinische Methoden unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper

Gemäß einem weiteren Aspekt liefert die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung des DPD-Mangelzustandes bei einem Patienten, das umfaßt, daß man

- (a) eine biologische Probe des Patienten mit einem monoklonalen Antikörper, wie oben definiert, behandelt und
- (b) das Immunokonjugat aus monoklonalem Antikörper und Dihydropyrimidinehydrogenase quantitativ bestimmt.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren, um die Empfindlichkeit eines Patienten, der unter Krebs leidet, für die Behandlung mit Antitumorzneimitteln der Reihe der 5-Fluoruracil-(5-FU)-Derivate abzuschätzen, das umfaßt, daß man

- (a) eine biologische Probe des Patienten mit einem monoklonalen Antikörper, wie oben definiert, behandelt,
- (b) das Immunokonjugat aus monoklonalem Antikörper und Humandihydropyrimidinehydrogenase quantitativ bestimmt, um den Gehalt der Dihydropyrimidinehydrogenase in der biologischen Probe des Patienten zu bestimmen, um ein Maß für die Empfindlichkeit zu erhalten.

Das obige Verfahren ermöglicht es dem Arzt, indem der gemessene Gehalt an DPD für einen Patienten mit dem einer Referenzgruppe von Patienten verglichen wird, die Wirksamkeit der obigen Medikamente vorherzusagen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren, um die Empfindlichkeit von Patienten, die unter Krebs leiden, für die Behandlung mit Antitumorzneimitteln der Reihe 5-Fluoruracil-(5-FU)-Derivaten abzuschätzen, das umfaßt, daß man

- (a) eine biologische Probe des Patienten mit einem monoklonalen Antikörper, wie oben definiert, behandelt,
- (b) quantitativ das Immunokonjugat aus monoklonalem Antikörper und Humandihydropyrimidinehydrogenase quantitativ bestimmt, um den Gehalt an Dihydropyrimidinehydrogenase in der biologischen Probe des Patienten zu bestimmen,
- (c) den Gehalt an Pyrimidinnucleosidphosphorylase in der biologischen Probe des Patienten bestimmt und
- (d) das Verhältnis des Gehaltes von Pyrimidinnucleosidphosphorylase zu dem Gehalt an Dihydropyrimidinehydrogenase berechnet, um ein Maß für die Empfindlichkeit zu erhalten.

Die obige Methode ermöglicht es dem Arzt, indem er das berechnete Verhältnis von Pyrimidinnucleosidphosphorylase zu dem Gehalt an Dihydropyrimidinehydrogenase für einen Patienten mit dem einer Referenzgruppe von Patienten, vergleicht, die Wirksamkeit der obigen Arzneimittel vorherzusagen.

Abkürzungen

Die folgenden Abkürzungen im folgenden werden häufig verwendet.

DPD: Dihydropyrimidinehydrogenase
PyNPase: Pyrimidinnucleosidphosphorylase
GST: Glutathion-S-transferase

IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

KLH: Keyhole-limpet-Hämocyanin

5-FU: 5-Fluoruracil

CFA: komplettes Freund's-Adjuvans

5 IFA: inkomplettes Freund's-Adjuvans

EIA: Enzymimmunoassay

ELISA: Enzym-linked Immunosorbent-Assay

DC: Dünnschichtchromatographie

PBS: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

10 PCR: Polymerase-Kettenreaktion

TMB: Tetramethylbenzidin

(TMB-Kit enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und H_2O_2)

TBS: Tris-gepufferte Kochsalzlösung (20 mM Tris/50 mM NaCl, pH 7,4)

TTBS: TBS, das 0,05% TWEEN®-20 enthält

15 Die vorliegende Erfindung wird mit den folgenden Beispielen weiter erläutert. Die folgende Beschreibung ist besser zu verstehen, indem auf die folgenden Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6-1 und 6-2 Bezug genommen wird.

Fig. 1 erläutert die Feststellung der Antigenizität der rekombinanten GST-DPD-Fusionsproteine, die in Beispiel 1 erzeugt wurden, mit Western-Blotting mit Anti-DPD-Peptid-2-Antikörpern. In Fig. 1 ist Bahn 1 ein Molekulargewichtsmarker, Bahn 2 ist GST-Protein selbst, Bahn 3 ist GST-DPD-Fusionsprotein.

20 Fig. 2 zeigt das Muster des Western-Blots der monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung gegen menschliche Gewebekomponenten, die DPD enthalten. In dieser Figur steht Bahn 1 für Molekulargewichtsmarker, Bahn 2 für rekombinantes DPD (rDPD), Bahn 3 für ein Xenotransplantat-Homogenisat einer Humantumorzelllinie, HT-3, und die Bahnen 4, 5 und 6 sind für die verschiedenen menschlichen Lungenkarzinomhomogenisate.

25 Fig. 3 zeigt eine Kalibrierungskurve, die mit dem erfindungsgemäßen ELISA erhalten wurde, der in Beispiel 3 beschrieben wird. In dieser Figur zeigt die horizontale Achse den Logarithmus der HT-3-Aktivität und die senkrechte Achse zeigt den Logarithmus der optischen Dichte (OD) bei der Wellenlänge von 450 nm. Fig. 3 zeigt, daß der ELISA der vorliegenden Erfindung die Bestimmung der DPD-Aktivität über einen Bereich von etwa 2,5 bis etwa 170 pmol/min/ml ermöglicht.

30 Fig. 4 erläutert die Beziehung zwischen dem DPD-Gehalt, der mit einem DPD-Aktivitätsassay nachgewiesen wird, und dem ELISA der vorliegenden Erfindung, sowohl bei normalem Gewebe als auch bei Tumorgewebe der Brust. Der DPD-Aktivitätsassay wird mit einer üblichen DC-Methode durchgeführt unter Verwendung von ^{14}C -radioaktiver Markierung. Der hier verwendete ELISA ist der, der in Beispiel 3 beschrieben wird.

35 Fig. 5 erläutert die Ergebnisse der Untersuchung der Empfindlichkeit für Antitumormittel in der Reihe der 5-Fluoruracil-(5-FU)-Derivate, wie FURFUROLON, indem das Verhältnis PyNPase/DPD bestimmt wird, wie in Beispiel 5 beschrieben. PyNPase-Gehalte wurden getestet unter Verwendung der von M. Nishida et al., 1996, in Biol. Pharm. Bull. 19 (11), 1407 bis 1411 beschriebenen Methode. Der hier verwendete ELISA ist der, der in Beispiel 3 beschrieben wird.

Fig. 6 zeigt die Ergebnisse eines Immunpräzipitationsassays unter Verwendung von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern, wie in Beispiel 6 beschrieben.

40 Fig. 6-1(a) und (b) zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE, wobei in (a) die Überstände und in (b) die Eluate der Kügelchen der Immunpräzipitate gezeigt sind. Fig. 6-2(a), (b) und (c) zeigt die Ergebnisse eines Western-Blottings, wobei in (a) das Ergebnis gezeigt wird, das aus dem Überstand erhalten wird, der unter Verwendung eines Anti-DPD-1-Polypeptidantikörpers untersucht wird, (b) das Ergebnis ist, daß bei der Elution der Immunpräzipitate erhalten wird, die unter Verwendung von Anti-DPD-1-Polypeptidantikörper untersucht werden und (c) das Ergebnis der gleichen Elutionen, wie in (b) zeigt, wobei der monoklonale Antikörper 3A5-6-1 der vorliegenden Erfindung für den Nachweis verwendet wurde. Die jeweiligen Bahnen entsprechen den Ergebnissen des Immunpräzipitationsassays unter Verwendung der folgenden Proben: Bahn 1: Maus IgG1; Bahn 2: 2B6-11-1; Bahn 3: 2E2-B3-1-3; Bahn 4: B9-12-1 und Bahn 5: 9C7-30-1. Die Bahn c in Fig. 6-2(b) ist der Durchlauf von Homogenisat von HT-3 als positive Kontrolle.

50 Beispiel 1

Herstellung der Antigene

55 Wie vorher beschrieben wurde über die Nucleotidsequenz von menschlichem DPD und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von H. Yokota et al., 1994, in J. Biol. Chem., 269, (37) 23192 bis 23196 berichtet (siehe SEQ ID Nr. 1 und SEQ ID Nr. 2). Auf Basis der genetischen Information von Position 1170 bis Position 3164 von SEQ ID Nr. 1 wurde ein Fusionsprotein als Antigen hergestellt, wobei das Fusionsprotein exprimiert wurde als GST-DPD-Fusionsprotein mit Hilfe des Wirtsorganismus E. coli JM 109, der mit dem Vektor pGEX 4 T-3 transformiert war, der die unten beschriebene genetische Information trug.

60

1. Konstruktion eines DPD-Expressionsvektors

65 Auf Basis der genetischen Information von Position 1170 bis 3164 von SEQ ID Nr. 1 wurden drei DNA-Primer hergestellt, um ein Segment des DPD-Gens mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu klonieren. Primer 1 (Eco RI-linker + sense) wurde als 25-mer hergestellt mit einer Sequenz, die aus einem Eco RI-linker (CGCGAATTC) am 5'-Ende und einem positiven Strang, der Nucleotiden 1770 bis 1785 der SEQ ID Nr. 1 entsprach, bestand.

Primer 1: 5'-CGCGAATTC(TTTTGAAGCTGGATGG-3' (SEQ ID NO: 3)

(1770 Eco RI-linker + sense)

Primer 2 (Eco RI-linker + antisense) wurde als 26-mer hergestellt mit einer Sequenz, die aus einem Eco RI-linker am 5'-Ende und einem negativen Strang, der komplementär zu den Nucleotiden 3148 bis 3164 von SEQ ID Nr. 1 war, bestand.

Primer 2: 5'-CGCGAATTCCTCACCTTAACACACCGG-3' (SEQ ID NO: 4)

(3164 Eco RI-linker + antisense)

Primer 3 (antisense) wurde hergestellt als 16-mer mit einer Sequenz, die komplementär zu der Sequenz war, die den Nucleotiden 3495 bis 3510 von SEQ ID Nr. 1 entspricht.

Primer 3: 5'-AATCAAATATGGAGCA-3' (SEQ ID NO: 5)

(3510 antisense)

Die gesamte RNA wurde aus der humanen Lungendiploidzelllinie WI 38 Zelle (ATCC CLL-75) mit einer üblichen Methode unter Verwendung eines RNA-Isolierungs-Kits (Stratagene, LaJolla, CA, USA) präpariert, auf Basis der sauren Guanidiniumthiocyanatphenolchloroform-Extraktions-(AGCP)-Methode (siehe z. B. P. Chomczynski und N. Sacci, 1987, Anal. Biochem. 162, 156 bis 159) und wurde einer reversen Transkriptionsreaktion mit reverse Transkriptase RAV-2 unter Verwendung von Primer 3 unterzogen, um ein cDNA-Präparat zu erhalten. Bei der Reaktion wurden 1 µg der gesamten RNA 60 Minuten lang der reversen Transkriptionsreaktion in 20 µl der Reaktionslösung bei 42°C unterzogen und danach wurde die reverse Transkriptase denaturiert durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C. Das cDNA-Präparat, das so erhalten wurde, wurde bis zur Verwendung für die PCR-Amplifikation auf 4°C gehalten. Die für die Synthese der cDNA des ersten Strangs verwendete Pufferlösung enthielt 5 mM MgCl₂, jeweils 1 mM dGTP, dATP, dTTP und dCTP, RNase-Inhibitor, 20 Einheiten reverse Transkriptase RAV-2 und 0,75 µM der Primer.

Dann wurde dieses cDNA-Präparat der PCR-Amplifikation unterzogen unter Verwendung der Primer 1 und 2 und eines kommerziellen PCR-Kits, nämlich RT-PCR-Kit (Takara Shuzo, Shiga, Japan) nach den Anleitungen zur Verwendung des Kits mit der Ausnahme, daß DNA-Polymerase (3,5 Einheiten pfu) anstelle von Tag-Polymerase in einer Temperaturwechselvorrichtung (ZYMOREACTOR II, ATTO, Tokio, Japan) verwendet wurde. Die Pufferlösung für die PCR-Amplifikation mit einem Gesamtvolumen von 100 µl enthielt 2 mM MgCl₂, jeweils 0,2 mM dGTP, dATP, dTTP und dCTP und jeweils 0,4 µM der Primer. Das PCR-Programm war 32 Zyklen 30 Sekunden lang bei 94°C, 1 Minute lang bei 55°C und 4 Minuten lang bei 75°C. Die so amplifizierten DPD-cDNA-Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese isoliert als eine Bande, die 1,4 kbp entsprach, und dann unter Verwendung eines QIAEX11-Gel-Extraktions-Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gereinigt. Das gereinigte cDNA-Fragment wurde mit Eco-RI verdaut und das Eco-RI-Fragment wurde in die Eco-RI-Stelle des Vektors pGEX4T-3 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) unter Verwendung eines DNA-Ligierungs-Kits (Takara Shuzo, Shiga, Japan) bei 16°C über Nacht eingesetzt. Der so erhaltene Vektor (im folgenden als pGEX4T-3-DPD bezeichnet) konnte ein GST-DPD-Fusionsprotein exprimieren. Die Teilnucleotidsequenz des obigen Insertionsfragmentes wurde bestimmt und es wurde bestätigt, daß sie die erwartete Untersequenz des DPD-Gens hatte.

2. Expression des GST-DPD-Fusionsproteins

E. coli JM109 (Toyobo, Osaka, Japan) wurde mit pGEX4T-3-DPD transformiert und der Transformant wurde in dem Medium SOB (20 g/l Bactotrypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 0,5 g/l Natriumchlorid, 0,186 g/l Kaliumchlorid und 0,95 g/l Magnesiumchlorid; pH 7,0), das 50 µg/ml Ampicillin enthielt, bei einer Temperatur von 22°C gezüchtet, um das Fusionsprotein zu exprimieren. Die Zellen des E. coli-Transformanten wurden behandelt durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und wurden etwa 16 Stunden lang bei 22°C inkubiert und anschließend einer Beschallung in einer gepufferten Lösung unterzogen, die 1% TRITON®-X100, 1% Sarcosyl, 10 mM DTT und 2 mM EDTA/PBS enthielt. Das Zellysat wurde zentrifugiert und die lösliche Fraktion wurde auf eine Glutathion-Sepharose-4B-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Das adsorbierte GST-DPD-Fusionsprotein wurde mit 10 mM reduziertem Glutathion eluiert. Das GST-DPD-Fusionsprotein wurde als Protein mit etwa 75 kDa auf SDS-PAGE identifiziert.

Dieses Fusionsprotein wurde durch Reaktion mit einem Anti-DPD-Peptidantikörper bestätigt. Für diesen Zweck wurden zwei Peptide von DPD, nämlich Peptid 1 (SEQ ID Nr. 6) und Peptid 2 (SEQ ID Nr. 7) chemisch synthetisiert auf Basis der als SEQ Nr. 2 beschriebenen Sequenz und wurden mit KLH gekuppelt mit Hilfe der Glutaraldehydmethode, um die Antigene zu erhalten, wie z. B. von Harlow et al., 1988, in "Antibodies: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, New York, USA, Seiten 78 bis 79 beschrieben. Die jeweiligen Antigene in einer Menge von 200 µg wurden zusammen mit CFA den Kaninchen subcutan injiziert, um die Tiere zu immunisieren und anschließend erhielten die Tiere Booster-Dosen der gleichen Menge der Antigene mit IFA. Die so erzeugten Antiseren wurden mit einer KLH-Säule (einer Säule, auf der KLH auf einem Träger immobilisiert ist, nämlich Affigel-10, erhältlich von BioRad, Hercules, CA, USA) behandelt, um Anti-KLH-Antikörper zu entfernen und dann gereinigt, indem sie auf eine Protein-G-Säule (MAB Trap GII, Pharmacia, Uppsala, Schweden) oder eine Peptidsäule aufgetragen wurden und mit einem Puffer von 0,1 M Glycin-HCl, pH 3,0, eluiert wurden und anschließend mit 1 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, vor der Verwendung neutralisiert wurden. Die Peptidsäule wurde hergestellt, indem das oben erwähnte Peptid 1 oder Peptid 2 an Affigel-15 (BioRad, Hercules, CA, USA) gekuppelt wurde. Beide polyklonalen Antikörper, gegen DPD-Peptid 1 und gegen DPD-Peptid 2, reagierten mit DPD aus menschlicher und Mäuseleber beim Western-Blotting und wurden daher verwendet, um die Erzeugung von GST-DPD-Fusionsprotein zu bestätigen. Wie oben beschrieben, wurde bestätigt, daß der Transformant das GST-DPD-Fusionsprotein erzeugte, durch Western-Blotting mit Anti-DPD-Peptid 2 (siehe Fig. 1). In Fig. 1 war Bahn 1 ein Molekülmarker, Bahn 2 GST-Protein selbst, Bahn 3 GST-DPD-Fusionsprotein. Wie auf Bahn 3 zu sehen ist, wurde bestätigt, daß das Fusionsprotein ein Protein mit etwa 75 kDa war.

Beispiel 2

Herstellung von monoklonalen Anti-DPD-Antikörpern

1. Zellfusion

GST-DPD-Fusionsprotein, das in Beispiel 1 hergestellt wurde (50 µg/Tier) wurde zusammen mit CFA in Balb/c-Mäuse in einem Volumen von 100 µl/Maus intraperitoneal injiziert und es folgte eine intraperitoneale Booster-Dosis von etwa 10 µg/Tier GST-DPD-Protein zusammen mit IFA zweimal nach einem Intervall von 2 Wochen. 3 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die sensibilisierten Mäuse getötet, um die Milz zu entfernen, und Milzzellen wurden präpariert. Die so erhaltenen Milzzellen wurden sorgfältig mit serumfreiem RPMI-1640-Medium (Nikken Seibutu Igaku Kenkyusho, Kyoto, Japan) gewaschen, das auf etwa 37°C vorgewärmt worden war. Die anschließenden Fusionsverfahren wurden bei 37°C unter Verwendung vorgewärmter Reagenzien, einschließlich der Pufferlösung, durchgeführt.

Die Mausmyelomzelllinie P3x63 Ag8-U1 (erhalten von Flow Laboratories Ltd., Irvine, UK) wurde auch sorgfältig mit dem serumfreien RPMI-1640-Medium gewaschen. Die Milzzellen (etwa 4×10^8) wurden mit der Mausmyelomzelllinie P3x63 Ag8-U1 (8×10^7) im Verhältnis von 5 : 1 vermischt und die Zellfusion wurde wie folgt durchgeführt. Die Mischung der Zellen wurde durch Zentrifugation pelletisiert und das Medium abgesaugt, dann wurden zu dem Pellet der Zellmischung 250 µl 50% Polyethylenglycollösung (PEG1500, Boehringer Mannheim) langsam 1 Minute lang unter Rühren des Pellets mit der Spitze der Mikropipette zugegeben; anschließend wurden weitere 250 µl 50% PEG-Lösung langsam 1 Minute lang unter Rühren des Pellets mit der Spitze der Mikropipette zugegeben und dann wurde das Rühren durch sanftes Drehen des Röhrchens 2 Minuten lang fortgesetzt. Zu der Zellfusionsmischung wurden 50 ml serumfreies RPMI-1640-Medium (Nikken Seibutu Igaku Kenkyusho, Kyoto, Japan) langsam tropfenweise 5 Minuten lang zugegeben und die Zellen wurden durch Zentrifugation gewaschen, um PEG zu entfernen.

Die Mischung der nach der Zellfusion pelletisierten Zellen wurde wieder in einem Medium aus RPMI-1640 (Nikken Seibutu Igaku Kenkyusho, Kyoto, Japan), das 10% fötales Kälberserum (FCS), Penicillin/Streptomycin und 2 ME enthielt, suspendiert und in die Näpfe von 96-Napf-Platten pipettiert, die dann unter 5% CO₂ bei 37°C inkubiert wurden. An den Tagen 2, 4 und 7 während der Inkubation wurde die halbe Menge des Mediums in jedem Napf durch HAT-Medium (hergestellt durch Zugabe von HAT-Lösung (Flow Laboratories Ltd., Irvine, UK) zu 10% FCS, das RPMI-Medium enthielt) ersetzt und die Inkubation wurde fortgesetzt. Vom 10. Tag der Inkubation an wurden in einigen der Näpfe traubenförmige Kolonien gebildet und schließlich wurde die Vermehrung der Hybridomazellen in 1056 Näpfen beobachtet.

2. Screenen der monoklonalen Antikörper

(2-1) Primäres Screenen

Alle Näpfe, bei denen eine Vermehrung der Hybridomas beobachtet wurde, wurden mit ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay) auf positive Näpfe wie folgt untersucht. Die Näpfe von 96-Napf-Immuplatten (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit GST-DPD-Fusionsprotein oder GST beschichtet unter Verwendung einer Menge von 50 µl/Napf der Lösungen, die 1 µg/ml jedes Proteins enthielten. Nicht adsorbiertes Protein wurde mit TTBS ausgewaschen und die Blockierung wurde bewirkt durch 1-stündige Inkubation mit TBS, das 3% Magermilch enthielt. Die Näpfe wurden wiederum mit TTBS gewaschen und es wurden 50 µl/Napf des Hybridomakulturüberstandes zugegeben und 1 Stunde auf 37°C gehalten. Nachdem die entsprechenden Näpfe mit TTBS dreimal gewaschen worden waren, wurde mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiertes Ziege-Antimaus-Immunglobulin IgG+A+M (KPL) zugegeben und die Platten wurden 1 Stunde als auf 37°C gehalten. Die jeweiligen Näpfe wurden viermal mit TTBS gewaschen und dann wurde ein Substrat (TMB, Microwell Kit System, KPL) zugegeben. Nach Abschluß der Reaktion durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure wurde die Absorption bei 450 nm gemessen unter Verwendung eines Mikroplattenlesegeräts. Die positiven Näpfe, die stärker mit der Schicht aus GST-DPD-Fusionsprotein reagierten als der mit GST, wurden als Primärvorrat zusammengefaßt.

(2-2) Sekundäres Screenen

Um die Wirksamkeit des Screenens sicherzustellen, wurde ein zweites Screenen durchgeführt unter Verwendung eines rekombinanten Proteins mit der vollständigen DPD-Sequenz bei einem Western-Blotting.

(A) Herstellung eines rekombinanten Proteins mit der vollen Sequenz von DPD

Ein rekombinantes Protein mit der vollen Sequenz von DPD wurde hergestellt, indem die gesamte Länge der cDNA von DPD auf Basis der RT-PCR-Klonierung hergestellt wurde und durch Expression des in einen E. coli-Expressionsvektor, pTrrHisA (Invitrogen, San Diego, USA), eingesetzten Gens, wobei diese Methode im wesentlichen die gleiche war wie die im Fall der Klonierung und Expression des GST-DPD-Fusionsproteins beschriebene.

Zuerst wurde cDNA des ersten Strangs hergestellt durch eine reverse Transkriptionsreaktion eines mRNA-Präparats von Humanplacenta und Leber (Clontech, Palo Alto, CA, USA) unter Verwendung des synthetischen Primers 2 und von RAV-2-reverse Transkriptase. Dann wurde eine PCR-Amplifikation der vorgesehenen cDNA durchgeführt unter Verwendung der synthetischen Primer 1 und Primer 2 und von pfu DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die PCR wurde durchgeführt unter Verwendung eines Takara RT-PCR-Kits nach den Anleitungen zur Verwendung in einer Temperaturwechselvorrichtung ZYMOREAKTOR 11 (ATTO, Tokio, Japan) mit 35 Zyklen 30 Sekunden bei 94°C, 1 Minute bei 55°C und 8 Minuten bei 75°C. Die so amplifizierten cDNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese auf 1% Agarosegel getrennt und die DNA in der gewünschten Bande wurde gereinigt unter Verwendung des DNA-Reinigungs-

kits QIAEX11 (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Das gereinigte cDNA-Fragment wurde mit Eco-RI verdaut und anschließend in die Eco-RI-Stelle eines Expressionsvektors subkloniert, nämlich pTrcHisA (Invitrogen, San Diego, USA). Die so klonierte DPD-cDNA exprimiert ein Protein mit etwa 120 kDa als Fusionsprotein des vollständigen DPDs mit einem mit Histidin markierten Protein, das für das weitere Screening verwendet wurde.

(B) Screenen

Das oben erhaltene rekombinante DPD wurde einer Elektrophorese auf NPG-D520L-Gel (Pagel, ATTO, Tokio, Japan) nach der Methode von Laemmli unterworfen und das Protein wurde auf PVDF-Membranen (Immobilon, Millipore, Bedford, MA, USA) geblottet unter Verwendung eines Semi-Dry-Blotters (ATTO, Tokio, Japan). Die PVDF-Membranen, auf die das DPD-Protein geblottet wurde, wurden blockiert unter Verwendung von TBS, das 3% Magermilch enthielt, und wurden mit TTBS gewaschen und anschließend 1 Stunde lang der Reaktion mit den Kulturüberständen der Hybridomas, wie in Beispiel 1 beschrieben, auf einem Screener Blotter Mini 28 (Sanplatec Corp., Japan) bei Raumtemperatur unterzogen. Dann wurden die PVDF-Membranen nach dem Waschen mit TTBS mit mit HRP-markiertem Ziege-Antimaus-IgG+A+M-Antikörper (KPL) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Membranen wurden wiederum mit TTBS gewaschen und einer Farbreaktion ausgesetzt unter Verwendung von Konica Immunostaining HRP-1000 (Konica, Tokio, Japan). Die Kolonien, wie z. B. die, die mit 2B6, 9C7, 5E6, 3A5 und 6H5 bezeichnet wurden, die stark mit dem rekombinanten DPD mit etwa 120 kDa reagierten, wurden als Kandidaten gesammelt. Ein monoklonaler Antikörper, der von einem speziellen Hybridom erzeugt wird, z. B. Hybridom 2B6, wird hier bezeichnet, indem "Mab" dem Anfang des Namens des Hybridoms zugefügt wird, z. B. Mab-2B6.

Die obigen Kandidaten wurden kloniert, indem die Grenzwert-Verdünnungsmethode zwei- oder mehrmals wiederholt wurde, um die Hybridomazelllinien zu etablieren (einschließlich z. B. 2B6-11-1, 9C7-30-1, 5E6-19-1, 3A5-6-1 und 6H5-42-1). Nach der ersten Grenzwert-Verdünnung wurde die Spezifität der obigen monoklonalen Antikörper, d. h. Mab-2B6-11, Mab-9C7-30, Mab-5E6-19, Mab-3A5-6 und Mab-6H5-42 mit Western-Blotting ausgewertet unter Verwendung der DPD-haltigen Flecken.

Fig. 2 zeigt die Ergebnisse des Western-Blottings für monoklonale Antikörper, die mit den Hybridomazelllinien 2B6-11, 9C7-30, 3A5-6-1, 5E6-19 und 6H5-42 erzeugt wurden. Wie in dieser Figur gezeigt, wurden die entstehenden Immunkonjugate mit den Antikörpern und DPD rund um die Position des Molekulargewichts von etwa 110 bis 120 kDa beobachtet.

Die Unterklasse der monoklonalen Antikörper, die mit den obigen Hybridomazelllinien erzeugt wurden, wurde untersucht unter Verwendung des Maus-Mono-Ab-ID-EIA-Kits (Zymed, San Francisco, CA, USA) und wurde bestimmt als Mab-2B6-11-1 (IgG1, κ), Mab-9C7-20-1 (IgG1, κ), Mab-5E6-19-1 (IgG3, κ), Mab-3A5-6-1 (IgM, κ) bzw. Mab-6H5-42-1 (IgM, κ). Es wurde bestätigt, daß die obigen monoklonalen Antikörper für ein Sandwich-ELISA zum Nachweis von DPD anwendbar waren. Um jedoch ein empfindlicheres ELISA-System zu erzeugen, wurde beschlossen, ein weiteres Screening durchzuführen, da die Konzentration von DPD in Tumorgewebe niedriger als in Leber erwartet wurde und eine hohe Empfindlichkeit erwünscht ist, um eine Unterscheidung zwischen einem DPD-Mangelgehalt und einem normalen Gehalt zu treffen.

(2-3) Drittes Screenen

Es wurde der monoklonale Antikörper von Hybridom 3A5-6-1 als Repräsentant genommen, und weitere monoklonale Antikörper, die andere Epitope erkennen, als die, die von dem Antikörper Mab-3A5-6-1 erkannt werden, und die eine höhere Empfindlichkeit beim Nachweis von DPD in Geweben, als die oben erwähnten Antikörper erreichen, gescreent.

Der monoklonale Antikörper Mab-3A5-6-1 wurde verwendet, um die Näpfe der Platte zu beschichten unter Verwendung von 50 μ l/Napf in einer Konzentration von 10 μ g/ml und nachdem ungebundener Antikörper entfernt worden war, wurden die jeweiligen Näpfe 1 Stunde lang bei Raumtemperatur blockiert unter Verwendung von TBS, das 3% Magermilch enthielt. Nach dem Waschen mit TTBS wurden die Näpfe mit 50 μ l/Napf eines Maus-Leber-Homogenisats in einer Konzentration von etwa 2 mg/ml bei Raumtemperatur 1 Stunde lang umgesetzt. Nach Waschen mit TTBS wurden die Näpfe mit dem Primärvorrat des Hybridomakulturüberstandes in einer Menge von 50 μ l/Napf 1 Stunde lang bei 37°C umgesetzt. Nachdem wiederum mit TTBS gewaschen worden war, wurden die Näpfe mit mit HRP markierten Ratten-Antimaus-IgG1-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Zymed, San Francisco, CA, USA) 1 Stunde lang bei 37°C umgesetzt. Nach dem Waschen mit TTBS wurden die Näpfe einer Farbentwicklung mit dem TMB-Mikronapf-Peroxidase-Kitsystem (KPL) unterzogen, dann wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure und die Absorption wurde bei 450 nm gemessen unter Verwendung eines Mikrotiterplattenlesegeräts.

Die 22 Näpfe mit starker Reaktion wurden bestimmt und die Hybridomas dieser Näpfe wurden einem weiteren Screening unterzogen auf gleiche Weise, wie oben beschrieben, indem das Maus-Leber-Homogenisat durch die Homogenisate von Humantumorzelllinien HT-3 und MCF-7 ersetzt wurde. Das HT-3 hatte eine DPD-Aktivität von 160 pmol/min/mg Protein und wurde als einzige Bande um etwa 110 kDa mit Western-Blotting nachgewiesen unter Verwendung von Kaninchen-Anti-DPD-Peptid 1 oder polyklonalem Anti-Peptid-2-Antikörper. Während andererseits die Zelllinie MCF-7 eine DPD-Aktivität von etwa 1,6 pmol/min/mg hatte, wurde sie bei dem gleichen Western-Blotting nicht nachgewiesen. Somit wählten die Erfinder die Hybridomas aus (als 4B9 und 2E2 bezeichnet), die stark mit der Zelllinie HT-3, nicht aber mit der Zelllinie MCF-7, reagierten. Diese Hybridomas 4B9 und 2E2 wurden weiter zwei- oder mehrmals der Grenzwert-Verdünnungsmethode unterzogen und die Hybridomaklone 4B9-12-1 und 2E2-B3-1-3 (deren Antikörper als IgG1, κ , bestimmt wurden) wurden etabliert.

Die monoklonalen Antikörper Mab-4B9-12-1 und Mab-2E2-B3-1-3 wurden in ihrer Spezifität für DPD-Antigene in solubilisiertem Zustand durch Immunpräzipitation bestätigt.

(2-4) Reinigung der monoklonalen Antikörper

Im allgemeinen wird, sobald ein Hybridom, das erfindungsgemäße monoklonale Antikörper erzeugen kann, etabliert ist, die Herstellung und Reinigung der monoklonalen Antikörper durchgeführt, mit zur Herstellung und Reinigung von monoklonalen Antikörpern im Stand der Technik bekannten Mitteln. Z.B. kann die Herstellung der monoklonalen Antikörper durchgeführt werden, indem die Hybridomazellen in einem geeigneten Kulturmedium gezüchtet werden und die Antikörper aus der Kultur gewonnen und gereinigt werden. Alternativ kann die Vermehrung der Hybridomazellen durchgeführt werden, indem die Zellen in peritoneale Ascites der Maus gepflanzt werden. Die Herstellung und Reinigung der monoklonalen Antikörper wird mit einer üblichen Methode durchgeführt, die beispielsweise im folgenden für spezifische monoklonale Antikörper ausgeführt ist.

1) Mab-4B9-12-1

Die Hybridomazelllinie 4B9-12-1 wurde in einem serumfreien Medium (PM 1000-Kit, Eiken, Tokio, Japan) bei einer Zellkonzentration von etwa 5×10^5 /ml gezüchtet. Der Überstand der Kultur wurde gesammelt und die Antikörper (IgG) wurden gereinigt, indem der Überstand auf eine HiTrap-Protein-G-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wie folgt aufgetragen wurde.

Die HiTrap-Protein-G-Säule wurde mit 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) equilibriert und dann wurde das Überstandpräparat auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 20 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung wurden die IgG-Fractionen mit 0,1 M Glycin-HCl-Puffer (pH 3,0) eluiert. Das so gesammelte Eluat wurde mit 1 M Tris-HCl (pH 9,0) neutralisiert und dann gegen PBS dialysiert. Die Proteinbestimmung der gereinigten Antikörperfraktion unter Verwendung des BIO-RAD Dc-Protein-Assay-Kits (Biorad, Hercules, CA, USA; die Kontrolle war BSA) zeigte etwa 4 mg Antikörper aus 300 ml Kulturüberstand. Die Unterklasse dieses monoklonalen Antikörpers wurde bestimmt als IgG1, κ .

2) Mab-3A5-6-1

Eine Woche nach der Injektion von 0,5 ml Pristan (Sigma, St. Louis, MO, USA) intraperitoneal in Mäuse, wurden 5×10^6 Hybridoma-3A5-6-1-Zellen in die Bauchhöhle der Tiere durch Injektion geimpft. Nach 2 Wochen wurde Ascites von den Tieren gesammelt, zentrifugiert und durch 0,8 μ m Membranfilter filtriert. Die Reinigung der Antikörper (IgM) wurde durchgeführt unter Verwendung des ImmunoPure IgM-Reinigungskits (Pierce, Rockford, Illinois, USA). Zu 0,5 ml Ascites wurden 0,5 ml ImmunoPure IgM-Bindungspuffer zugegeben und die Mischung auf eine ImmunoPure-Immobilized-MBP-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit ImmunoPure IgM-Bindungspuffer wurden die Antikörper mit ImmunoPure IgM-Elutionspuffer eluiert und die Fraktion der Antikörper wurde gegen PBS dialysiert. Die Proteinbestimmung unter Verwendung von BSA als Kontrolle zeigte, daß etwa 2 mg Antikörper (IgM) aus etwa 0,5 ml Ascites erhalten worden waren.

Beispiel 3

40 ELISA unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper

Als immunologische quantitative Assays sind Ein- Punkt-Bindungsmethoden und Zwei-Punkt-Bindungsmethoden (sogenannte Sandwichassays) im Stand der Technik wohlbekannt. Es kann allgemein gesagt werden, daß Zwei-Punkt-Bindungsmethoden vorteilhaft sind, da eine höhere Genauigkeit und höhere Empfindlichkeit erreicht wird. Die im obigen Beispiel 2 erhaltenen monoklonalen Antikörper wurden verwendet, um Sandwich-ELISA-Assaysysteme, wie unten beschrieben, zu entwickeln.

(a) Beschichtung mit dem ersten Antikörper

Eine Lösung von Mab-4B9-12-1 wurde hergestellt unter Verwendung von PBS (pH 7,4) in einer Konzentration von 10 μ g/ml und 50 μ l dieser Lösung wurden zu jedem Napf von 96-Napf-Immunoplaten (Maxsorp, Nunc, Roskilde, Dänemark) zugegeben und die Nöpfe wurden mit einem Membrandichtungsmittel verschlossen und bei 4°C über Nacht inkubiert, um den Antikörper zu immobilisieren (in diesem Beispiel wurden die Platten während der Inkubation verschlossen).

Nach der Gewinnung von ungebundenem Antikörper wurden die Nöpfe mit TTBS gewaschen und dann blockiert, indem mit TBS, das 3% Magermilch enthielt, 3 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

(b) Anwendung der Proben

Als Standardprobe, die DPD enthielt, wurde ein HT-3-Xenotransplantat-Homogenisat in einer Konzentration von 2 mg/ml hergestellt. Eine Reihenverdünnung des Homogenisats wurde mit TBS, das 1% Magermilch enthielt, hergestellt und 50 μ l der Proben wurden in die jeweiligen Nöpfe gegeben und dann wurde die Immunoplatte bei 37°C 2 Stunden lang inkubiert.

65 (c) Reaktion mit dem zweiten Antikörper

Nach dem Waschen der Nöpfe mit TTBS wurde die zweite Antikörperlösung, die 2 μ g/ml Mab-3A5-6-1 in TBS, das 3% Magermilch enthielt, enthalten war, jedem Napf in einem Volumen von 50 μ l zugegeben und die Immunoplatte

wurde bei 37°C 1 Stunde lang inkubiert. Durch diese Behandlung wurde ein Immunkonjugat von [Mab-4B9-12-1]-[DPD]-[Mab-3A5-6-1], worin DPD sandwichartig zwischen den zwei monoklonalen Antikörpern angeordnet war, erzeugt, wenn DPD in den obigen Proben vorhanden war.

(d) Markierung

Für den Nachweis des Konjugats wurde mit HRP markiert er Ratten-Antimäus-IgM-Antikörper (Zymed, San Francisco, CA, USA) verwendet, um das Konjugat zu markieren. Dieser im Handel erhältliche markierte Antikörper wurde nach einer 1000-fachen Verdünnung mit TBS, das 3% Magermilch enthielt, verwendet.

Die Näpfe der Immunoplatte wurden mit TTBS gewaschen und es wurden 50 µl des obigen mit HRP markierten Antikörpers zugegeben und die Platte wurde 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert.

(e) Nachweis

Nach dem Waschen der Näpfe wurde die Farbreaktion durchgeführt, indem das TMB-Mikronapf-Peroxidase-Kitsystem (KPL) verwendet wurde, das TMB und H₂O₂ als Substrat enthielt, zur Entwicklung der Farbe in der enzymatischen Reaktion, die durch HRP katalysiert wird. Die Substratlösung wurde den jeweiligen Näpfen zugegeben und nachdem die Reaktion durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure gestoppt worden war, wurde die Absorption der Näpfe bei 450 nm gemessen mit einem Mikroplattenlesegerät (BioRad, Hercules, CA, USA).

Die repräsentativen Ergebnisse sind in Tabelle 1 unten zusammengefaßt und die Kalibrierungskurve, die mit dem obigen ELISA-System mit Mab-4B9-12-1 und Mab-3A5-6-1 erhalten wurde, ist in Fig. 3 dargestellt. In dieser Figur steht die horizontale Achse für den Logarithmus der HT-3-Aktivität und die senkrechte Achse für den Logarithmus der optischen Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm. Wie in Fig. 3 gezeigt, ermöglicht es das ELISA-System der vorliegenden Erfindung, die DPD-Aktivität über einen Bereich von etwa 2,5 bis etwa 170 pmol/min/ml zu bestimmen. Diese hohe Empfindlichkeit des DPD-ELISA-Assays ist nützlich zur Bestimmung des DPD-Gehaltes in biologischen Proben aus dem menschlichen Körper. Außerdem macht es der obige DPD-ELISA möglich, den DPD-Gehalt Proben zu bestimmen bei einer Mangelkrankheit, von der bekannt ist, daß ein sehr geringer DPD-Gehalt vorhanden ist.

Tabelle 1

| HT-3-Aktivität* (pmol/min/ml) | OD450** |
|----------------------------------|---------|
| 167,5 | 1,313 |
| 83,75 | 0,894 |
| 41,88 | 0,548 |
| 20,94 | 0,320 |
| 10,47 | 0,175 |
| 5,23 | 0,105 |
| 2,61 | 0,060 |

* HT-3-Standard mit einer Aktivität von 167,5 pmol/mg/min wurde verwendet

** OD abgezogen vom Leerwert

Beispiel 4

Vergleich der Ergebnisse des ELISA und der DPD-Aktivität

Die Korrelation zwischen dem mit dem vorliegenden in Beispiel 3 beschriebenen ELISA-Verfahren bestimmten Gehalt und dem Anteil der enzymatischen Aktivität von DPD wurde untersucht. Die Proben waren Brustkrebsgewebe und benachbartes normales Gewebe, das chirurgisch entnommen wurde. Die Proben wurden in Form von Gewebekompositen präpariert. Kurz gesagt wurden zuerst Tumor und normales Gewebe in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), der 15 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM Kaliumphosphat enthielt, homogenisiert und dann mit 105 000 × g 90 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde über Nacht gegen 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) und 1 mM 2-Mercaptoethanol dialysiert.

Die DPD-Aktivität wurde mit einer DC-Plattenmethode bestimmt, ähnlich der von Fernandez-Salguero et al., 1995, in Biochem. Pharm. 50, 1015 bis 1020, beschrieben, wobei die Summe der 5-FU-Kataboliten, d. h. Dihydrofluoruracil, α -Fluor- β -ureidopropionat und α -Fluor- β -alanin, die aus [6- 14 C]-5-FU gebildet wurden, wie oben beschrieben gemessen wurde. Der ELISA wurde auf gleiche Weise durchgeführt, wie in Beispiel 3 beschrieben, unter Verwendung eines Scaber-Xenotransplantat-Homogenisats (105 pmol/min/mg) als Standard.

Jede Probe wurde sowohl mit dem obigen DC-Plattenverfahren als auch mit ELISA getestet und die Daten für jede Probe wurden auf einem Diagramm aufgetragen, auf der vertikalen Achse die Menge an DPD in pmol/min/mg, die mit ELISA gemessen wurde, und auf der horizontalen Achse die DPD-Aktivität, die mit der DC-Methode gemessen wurde, wie in Fig. 4 gezeigt. Eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen für den Aktivitätstest und den ELISA der vorliegenden Erfindung wurde bestätigt sowohl für Tumorgewebe als auch für normale Gewebe.

Beispiel 5

Anwendung des erfindungsgemäßen ELISA, um die Wirksamkeit von Antitumorzneimitteln in der Reihe der 5-Fluoruracil-(5-FU)-Derivate, wie FURTULON, zu messen

Einer der Repräsentanten der Antitumorzneimittel in der Reihe der 5-Fluoruracil-(5-FU)-Derivate, nämlich FURTULON (5'-Desoxy-5-fluoruridin (5'-dFUrd)) ist ein Proarzneimittel oder Prodrug, das durch Einwirkung von Pyrimidinnucleosidphosphorylase (PyNPase), d. h. Thymidinphosphorylase in menschlichen Zellen, in 5-FU umgewandelt wird.

Ein geeignetes Testsystem wurde entwickelt, zur Auswertung des Verhältnisses von PyNPase/DPD in Tumorgewebe. Dieses System umfaßt eine Kombination von ELISA-System für den Nachweis von PyNPase, wie von M. Nishida et al., 1996, Biol. Pharm. Bull. 19 (11), 1407 bis 1411 beschrieben, und dem ELISA-System der Erfindung, wie im obigen Beispiel 3 beschrieben.

Um zu untersuchen, ob das Verhältnis PyNPase/DPD ein Marker für die Wirksamkeit von FURTULON ist, wurde dieses Verhältnis für eine Anzahl von Tumorgeweben bestimmt, von denen bereits bekannt war, daß sie für FURTULON empfindlich sind, und für eine Anzahl von Tumorgeweben, von denen bereits bekannt war, daß sie refraktär für FURTULON sind. Die Zelllinien, die als beispielhaft für FURTULON-empfindliche Gewebe verwendet wurden, sind die folgenden neun Humantumoxenotransplantat-Zelllinien: Scaber (schuppenförmiges Karzinom (ATCC HTB-3), ZR-75 (Brustkarzinom), MCF-7 (Brustadenokarzinom, ATCC HTB-22), LoVo (Kolonrektalkrebs, ATCC CCL-229), MEN45 (Magenkrebs), SIHA (schuppenförmiger Krebs), ME-180 (Epidermalkarzinom), HCT116 (Kolonrektalkrebs) und COLO205 (Kolonrektalkrebs, ATCC CCL-222). Die als beispielhaft für FURTULON-refraktäre Gewebe verwendeten Zelllinien sind die folgenden sieben xeno-Transplantat-Zelllinien: SK-OV-3 (Eierstocktumor, ATCC HTB-77), MAD-MB-231 (Brustkarzinom), HT-29 (Kolonrektalkrebs, ATCC HTB-38), T-24 (Blasenkrebs, ATCC HTB-4), PC-3 (Prostataadenokarzinom), WiDr-1 (Kolonrektalkrebs, ATCC CCL-218) und MKN28 (Magenkrebs).

Die auf Basis des erfindungsgemäßen ELISA-Systems bestimmten Verhältnisse sind in dem Diagramm von Fig. 5 aufgetragen.

Wie in dieser Figur gezeigt, zeigten die FURTULON-empfindlichen Zelllinien wesentlich höhere Verhältnisse von PyNPase/DPD, als die refraktären Zelllinien.

Dieses Ergebnis zeigt, daß das Verhältnis von PyNPase/DPD in Tumorgeweben geeignet ist, um die Wirksamkeit von FURTULON bei der Behandlung von Patienten, die unter einem Tumor leiden, zu messen.

Beispiel 6

Immunpräzipitationstest unter Verwendung von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern

Ein Xenotransplantat-Homogenisat der Tumorzelllinie HT-3 wurde als biologische Probe, die DPD enthielt, verwendet. Das Xenotransplantat-Homogenisat (8,6 mg/ml) wurde zweimal über eine Protein-G-Sepharose-4B-Säule laufen gelassen, um Antikörper zu absorbieren, die von dem Wirt stammten, und wurde folgenden Immunpräzipitationsassay unterzogen.

In die Röhrchen, die 150 μ l HT-3-Xenotransplantat-Homogenisat enthielten, wurden 5 μ g erfindungsgemäße monoklonale Antikörper, die getestet werden sollten, gegeben und die Röhrchen wurden 2 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Dann wurden jeweils 20 μ l 50% Protein G-Sepharose 4B (Sigma, St. Louis, MO, USA) den Röhrchen zugegeben und die Mischungen wurden weitere 2 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Mischungen zentrifugiert, um sie in Kugelfraktionen und Überstände aufzutrennen. Die gesammelten Kugelfraktionen wurden mit 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) fünfmal gewaschen und dann mit 60 μ l 0,1 M Glycin-HCl-Puffer (pH 3,0) eluiert; die Eluate wurden mit 3 μ l 1 M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert, um die Präparate der Immunpräzipitation zu erhalten.

Die Proben der Überstände und die Eluate der Kugelfraktionen, die im folgenden als Kugeleluate bezeichnet werden, wurden mit SDS-PAGE und Western-Blotting analysiert.

Fig. 6 zeigt die Ergebnisse des Immunpräzipitationsassays unter Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper Mab-2B6-11-1, Mab-2E2-B3-1-3, Mab-4B9-12-1 und Mab-9C7-30-1.

Die Fig. 6-1(a) und (b) zeigen das elektrophoretische Muster der SDS-PAGE, wobei (a) die Überstände betrifft und (b) die Kugeleluate der Immunpräzipitate betrifft, wobei die Banden sichtbar gemacht wurden durch Anfärbung mit Silber (2D-Silberfärbung Daiichi, Daiichi Pure Chemicals, Tokio, Japan).

Fig. 6-2(a), (b) und (c) zeigt die Ergebnisse des Western-Blottings, wobei (a) das Ergebnis ist, das mit dem Überstand erhalten wurde, der unter Verwendung des Anti-DPD-1-Polypeptidantikörpers nachgewiesen wurde, (b) das Ergebnis ist für die Kugeleluate der Immunpräzipitate, die unter Verwendung Anti-DPD-1-Polypeptidantikörper nachgewiesen wurden und (c) das Ergebnis zeigt für die gleichen Kugeleluate, wie (b), wobei der monoklonale Antikörper 3A5-6-1 der

vorliegenden Erfindung zum Nachweis verwendet wurde. Die jeweiligen Bahnen entsprechen den Ergebnissen des Immunpräzipitationsassays unter Verwendung der folgenden Proben: Bahn 1: Maus IgG; Bahn 2: 2B6-11-1; Bahn 3: 2E2-B3-1-3; Bahn 4: 4B9-12-1 und Bahn 5: 9C7-30-1. Die Bahn c in Fig. 6-2(b) ist der Durchlauf des Homogenisats von HT-3 als positive Kontrolle.

Wie in Fig. 6-1(b) gezeigt, wurde die Immunpräzipitation beobachtet bei den Banden, die etwa 120 kDa entsprechen, im Fall der monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung, Mab-2E2-B3-1-3 (Bahn 3) und Mab-4B9-12-1 (Bahn 4). Auf dem PAGE-Gel entsprechen die Banden, die bei etwa 50 kDa und 25 kDa zu sehen sind, der schweren Kette und der leichten Kette der verwendeten Antikörper.

Gleichzeitig wurde ein Western-Blotting durchgeführt unter Verwendung des Überstands und des Kugeleluats. Entweder Kaninchen-Anti-DPD-Peptid-1-Antikörper oder Mab-3A5-6-1 wurde zum Nachweis von DPD verwendet. Wie in Fig. 6-1(a) gezeigt, wurde die DPD entsprechende Bande nicht beobachtet bei den Proben des Überstandes (siehe Bahnen 3 und 4), während die einzelnen Banden rund um 120 kDa beobachtet wurden unter Verwendung von Anti-DPD-1-Antikörper oder Mab-3A5-6-1 in den Proben, die aus den Kugeln eluiert wurden, die aus der Immunpräzipitation mit Mab-4B9-12-1 und Mab-2E2-B3-1-3 entstanden, wie in Fig. 6-2(b) und (c) gezeigt, was darauf hindeutet, daß die einzelne Bande, die bei 120 kDa auf SDS-PAGE beobachtet wurde, DPD entsprach. Weiterhin wurden die DPD-Aktivitäten in den Proben der Kugeleluate aus den Immunpräzipitaten mit Mab-4B9-12-1 und dem entsprechenden Überstand untersucht und es wurde nur bei den Kugeleluaten der Immunpräzipitate DPD-Aktivität gefunden, wie in Tabelle 2 unten gezeigt.

Tabelle 2

[DPD-Aktivität: pmol/min/ml]

HT-3-Homogenisat/Mab + Kügelchen

| Zugegebener Antikörper | Überstände | Kugeleluate |
|------------------------|------------|-------------|
| Maus IgG1 | 118,2 | <1,41 |
| 4B9-12-1 | <1,41 | 85,3 |

Diese Ergebnisse zeigen, daß die monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung, d. h. Mab-4B9-12-1 und Mab-2E2-B3-1-3 das aktive DPD-Molekül mit der nativen Konformation erkennen und daß die Spezifität dieser Antikörper für DPD sehr hoch ist, da ihre Immunpräzipitate als einzelne Banden gezeigt werden.

Außerdem wurde bestätigt, daß Mab-3A5-6-1 spezifisch das DPD-Molekül erkennt, das auch von Mab-4B9-12-1 spezifisch erkannt wurde, was die Verlässlichkeit des Sandwich-ELISA-Systems unter Verwendung dieser monoklonalen Antikörper der vorliegenden Erfindung sicherstellt.

Wie der Fachmann auf diesem Gebiet leicht sehen kann, sind erfindungsgemäße monoklonale Antikörper auch geeignet zur Herstellung einer Affinitätssäule für die Reinigung von DPD.

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5 (i) ANMELDER:

NAME: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

STRASSE: Grenzacher Straße 124

10 ORT: Basel

LAND: Schweiz

15 POSTLEITZAHL: CH - 4002

TELEFON: 061-688 25 11

TELEX: 962292/965542 hlr c

20

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Immunologische
Materialien und Verfahren zum Nachweis von
25 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase

30 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 3951 Basenpaare

40 (B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

50 (iii) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens

(iv) MERKMAL:

55 NAME/SCHLÜSSEL: CDS

LAGE: 1..3951

SEQUENZIERMETHODE: E

60 (iv) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 1

65

DE 198 37 391 A 1

| | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|----|
| GCTGTCACTT | GGCTCTCTGG | CTGGAGCTTG | AGGACGCAAG | GAGGGTTTGT | CACTGGCAGA | 060 | |
| CTCGAGACTG | TAGGCACTGC | CATGGCCCCCT | GTGCTCAGTA | AGGACTCGGC | GGACATCGAG | 120 | 5 |
| AGTATCCTGG | CTTTAAATCC | TCGAACACAA | ACTCATGCAA | CTCTGTGTTC | CACTTCGGCC | 180 | |
| AAGAAATTAG | ACAAGAAACA | TTGGAAGA | AATCCTGATA | AGAACTGCTT | TAATTGTGAG | 240 | |
| AAGCTGGAGA | ATAATTTTGA | TGACATCAAG | CACACGACTC | TTGGTGAGCG | AGGAGCTCTC | 300 | 10 |
| CGAGAAGCAA | TGAGATGCCT | GAAATGTGCA | GATGCCCCGT | GTCAGAAGAG | CTGTCCAACT | 360 | |
| AATCTTGATA | TTAAATCATT | CATCACAAGT | ATTGCAAACA | AGAACTATTA | TGGAGCTGCT | 420 | 15 |
| AAGATGATAT | TTTCTGACAA | CCCACTTGGT | CTGACTTGTG | GAATGGTATG | TCCAACCTCT | 480 | |
| GATCTATGTG | TAGGTGGATG | CAATTTATAT | GCCACTGAAG | AGGGACCCAT | TAATATTGGT | 540 | |
| GGATTGCAGC | AATTTGCTAC | TGAGGTATTC | AAAGCAATGA | GTATCCCACA | GATCAGAAAT | 600 | 20 |
| CCTTCGCTGC | CTCCCCCAGA | AAAAATGTCT | GAAGCCTATT | CTGCAAAGAT | TGCTCTTTTT | 660 | |
| GGTGTGGGGC | CTGCAAGTAT | AAGTTGTGCT | TCCTTTTGG | CTCGATTGGG | GTACTCTGAC | 720 | 25 |
| ATCACTATAT | TTGAAAAACA | AGAATATGTT | GGTGGTTTAA | GTACTTCTGA | AATTCCTCAG | 780 | |
| TTCCGGCTGC | CGTATGATGT | AGTGAATTTT | GAGATTGAGC | TAATGAAGGA | CCTTGGTGTA | 840 | 30 |
| AAGATAATTT | GCGGTAAAAG | CCTTTCAGTG | AATGAAATGA | CTCTTAGCAC | TTTGAAAGAA | 900 | |
| AAAGGCTACA | AAGCTGCTTT | CATTGGAATA | GGTTTGCCAG | AACCCAATAA | AGATGCCATC | 960 | |
| TTCCAAGGCC | TGACGCAGGA | CCAGGGGTTT | TATACATCCA | AAGACTTTTT | GCCACTTGTA | 1020 | 35 |
| GCCAAAGGCA | GTAAAGCAGG | AATGTGCGCC | TGTCACCTCTC | CATTGCCATC | GATACGGGGA | 1080 | |
| GTCTGTATTG | TACTTGGAGC | TGGAGACACT | GCCTTCGACT | GTGCAACATC | TGCTCTACGT | 1140 | 40 |
| TGTGGAGCTC | GCCGAGTGTT | CATCGTCTTC | AGAAAAGGCT | TTGTTAATAT | AAGAGCTGTC | 1200 | |
| CCTGAGGAGA | TGGAGCTTGC | TAAGGAAGAA | AAGTGTAAT | TTCTGCCATT | CCTGTCCCCA | 1260 | 45 |
| CGGAAGGTTA | TAGTAAAAGG | TGGGAGAATT | GTTGCTATGC | AGTTTGTTTCG | GACAGAGCAA | 1320 | |
| GATGAACTG | GAAAATGGAA | TGAAGATGAA | GATCAGATGG | TCCATCTGAA | AGCCGATGTG | 1380 | |
| GTCATCAGTG | CCTTTGGTTC | AGTTCTGAGT | GATCCTAAAG | TAAAAGAAGC | CTTGAGCCCT | 1440 | 50 |
| ATAAAATTTA | ACAGATGGGG | TCTCCCAGAA | GTAGATCCAG | AACTATGCA | AACTAGTGAA | 1500 | |
| GCATGGGTAT | TTGCAGGTGG | TGATGTCGTT | GGTTTGGCTA | ACACTACAGT | GGAATCGGTG | 1560 | 55 |
| AATGATGGAA | AGCAAGCTTC | TTGGTACATT | CACAAATACG | TACAGTCACA | ATATGGAGCT | 1620 | |
| TCCGTTTCTG | CCAAGCCTGA | ACTACCCCTC | TTTTACACTC | CTATTGATCT | GGTGGACATT | 1680 | |
| AGTGTAGAAA | TGGCCGGATT | GAAGTTTATA | AATCCTTTTG | GTCTTGCTAG | CGCAACTCCA | 1740 | 60 |
| GCCACCAGCA | CATCAATGAT | TCGAAGAGCT | TTTGAAGCTG | GATGGGGTTT | TGCCCTCACC | 1800 | 65 |

AAAACTTTCT CTCTTGATAA GGACATTGTG ACAAATGTTT CCCCCAGAAT CATCCGGGGA 1860
 ACCACCTCTG GCCCCATGTA TGGCCCTGGA CAAAGCTCCT TTCTGAATAT TGAGCTCATC 1920
 5 AGTGAGAAAA CGGCTGCATA TTGGTGTCAA AGTGTCACTG AACTAAAGGC TGACTTCCCA 1980
 GACAACATTG TGATTGCTAG CATTATGTGC AGTTACAATA AAAATGACTG GACGGAACCTT 2040
 10 GCCAAGAAGT CTGAGGATTG TGGAGCAGAT GCCCTGGAGT TAAATTTATC ATGTCCACAT 2100
 GGCATGGGAG AAAGAGGAAT GGGCCTGGCC TGTGGGCAGG ATCCAGAGCT GGTGCGGAAC 2160
 15 ATCTGCCGCT GGGTTAGGCA AGCTGTTTCA ATTCTTTTTT TTGCCAAGCT GACCCCAAAT 2220
 GTCACCTGATA TTGTGAGCAT CGCAAGAGCT GCAAAGGAAG GTGGTGCCAA TGGCGTTACA 2280
 GCCACCAACA CTGTCTCAGG TCTGATGGGA TTAATACTG ATGGCACACC TTGGCCAGCA 2340
 20 GTGGGGATTG CAAAGCGAAC TACATATGGA GGAGTGTCTG GGACAGCAAT CAGACCTATT 2400
 GCTTTGAGAG CTGTGACCTC CATTGCTCGT GCTCTGCCCTG GATTTCCCAT TTTGGCTACT 2460
 25 GGTGGAATTG ACTCTGCTGA AAGTGGTCTT CAGTTTCTCC ATAGTGGTGC TTCCGTCTCT 2520
 CAGGTATGCA GTGCCATTCA GAATCAGGAT TTTACTGTGA TCGAAGACTA CTGCACTGGC 2580
 30 CTCAAAGCCC TGCTTTATCT GAAAAGCATT GAAGAACTAC AAGACTGGGA TGGACAGAGT 2640
 CCAGCTACTG TGAGTCACCA GAAAGGGAAA CCAGTTCCAC GTATAGCTGA ACTCATGGAC 2700
 AAGAACTGC CAAGTTTTGG ACCTTATCTG GAACAGCGCA AGAAAATCAT AGCAGAAAAC 2760
 35 AAGATTAGAC TGAAAGAACA AAATGTAGCT TTTTACCAC TTAAGAGAAG CTGTTTTATC 2820
 CCCAAAAGGC CTATTCCTAC CATCAAGGAT GTAATAGGAA AAGCACTGCA GTACCTTGGA 2880
 40 ACATTGGTG AATTGAGCAA CGTAGAGCAA GTTGTGGCTA TGATTGATGA AGAAATGTGT 2940
 ATCAACTGTG GTAAATGCTA CATGACCTGT AATGATTCTG GCTACCAGGC TATACAGTTT 3000
 GATCCAGAAA CCCACCTGCC CACCATAACC GACACTTGTA CAGGCTGTAC TCTGTGTCTC 3060
 45 AGTGTTTGCC CTATTGTCGA CTGCATCAA ATGGTTTCCA GGACAACACC TTATGAACCA 3120
 AAGAGAGGCG TACCCTTATC TGTGAATCCG GTGTGTTAAG GTGATTGTG AACAGTTGC 3180
 50 TGTGAACTTT CATGTCACCT ACATATGCTG ATCTCTTAAA ATCATGATCC TTGTGTTTCA 3240
 CTC'TTTCCAA ATTAAAACAA ATATACATTT TCTAAATAAA AATATGTAAT TTCAAATAC 3300
 ATTTGTAAGT GTAAAAATG TCTCATGTCA ATGACCATTG AATTAGTGGC ATAAAAAGA 3360
 55 ATAATTCTTT TCTGAGGATA GTAGTTAAAT AACTGTGTGG CAGTTAATTG GATGTTCACT 3420
 GCCAGTTGTC TTATGTGAAA AATTAACTTT TTGTGTGGCA ATTAGTGTGA CAGTTTCCAA 3480
 60 ATTGCCCTAT GCTGTGCTCC ATATTGATT TCTAATTGTA AGTGAAATTA AGCATTTTGA 3540
 AACAAAGTAC TCTTTAACAT ACAAGAAAAT GTATCCAAGG AAACATTTTA TCAATAAAAA 3600
 65 TTACCTTTAA TTTTAATGCT GTTTCTAAGA AAATGTAGTT AGCTCCATAA AGTACAAATG 3660

DE 198 37 391 A 1

AAGAAAGTCA AAAATTATTT GCTATGGCAG GATAAGAAAG CCTAAAATTG AGTTTGTGGA 3720
 CTTTATTAAG TAAAATCCCC TTCGCTGAAA TTGCTTATTT TTGGTGTTGG ATAGAGGATA 3780
 GGGAGAATAT TTACTAACTA AATACCATTG ACTACTCATG CGTGAGATGG GTGTACAAAC 3840
 TCATCCTCTT TTAATGGCAT TTCTCTTTAA ACTATGTTCC TAACCAAATG AGATGATAGG 3900
 ATAGATCCTG GTTACCACTC TTTTACTGTG CACATATGGG CCCCAGGAATT C 3951

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1025 Reste
 (B) ART: Aminosäure
 (C) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

ORGANISMUS: Homo sapiens

(iv) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL:
 LAGE: 1..1025
 SEQUENZIERMETHODE:E

(iv) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 2

Met Ala Pro Val Leu Ser Lys Asp Ser Ala Asp Ile Glu Ser Ile Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Asn Pro Arg Thr Gln Thr His Ala Thr Leu Cys Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ala Lys Lys Leu Asp Lys Lys His Trp Lys Arg Asn Pro Asp Lys Asn
 35 40 45
 Cys Phe Asn Cys Glu Lys Leu Glu Asn Asn Phe Asp Asp Ile Lys His
 50 55 60

DE 198 37 391 A 1

Thr Thr Leu Gly Glu Arg Gly Ala Leu Arg Glu Ala Met Arg Cys Leu
 65 70 75 80
 5 Lys Cys Ala Asp Ala Pro Cys Gln Lys Ser Cys Pro Thr Asn Leu Asp
 85 90 95
 10 Ile Lys Ser Phe Ile Thr Ser Ile Ala Asn Lys Asn Tyr Tyr Gly Ala
 100 105 110
 15 Ala Lys Met Ile Phe Ser Asp Asn Pro Leu Gly Leu Thr Cys Gly Met
 115 120 125
 Val Cys Pro Thr Ser Asp Leu Cys Val Gly Gly Cys Asn Leu Tyr Ala
 20 130 135 140
 Thr Glu Glu Gly Pro Ile Asn Ile Gly Gly Leu Gln Gln Phe Ala Thr
 25 145 150 155 160
 Glu Val Phe Lys Ala Met Ser Ile Pro Gln Ile Arg Asn Pro Ser Leu
 30 165 170 175
 Pro Pro Pro Glu Lys Met Ser Glu Ala Tyr Ser Ala Lys Ile Ala Leu
 180 185 190
 35 Phe Gly Ala Gly Pro Ala Ser Ile Ser Cys Ala Ser Phe Leu Ala Arg
 195 200 205
 40 Leu Gly Tyr Ser Asp Ile Thr Ile Phe Glu Lys Gln Glu Tyr Val Gly
 210 215 220
 Gly Leu Ser Thr Ser Glu Ile Pro Gln Phe Arg Leu Pro Tyr Asp Val
 45 225 230 235 240
 Val Asn Phe Glu Ile Glu Leu Met Lys Asp Leu Gly Val Lys Ile Ile
 50 245 250 255
 Cys Gly Lys Ser Leu Ser Val Asn Glu Met Thr Leu Ser Thr Leu Lys
 260 265 270
 55 Glu Lys Gly Tyr Lys Ala Ala Phe Ile Gly Ile Gly Leu Pro Glu Pro
 275 280 285
 60 Asn Lys Asp Ala Ile Phe Gln Gly Leu Thr Gln Asp Gln Gly Phe Tyr
 290 295 300
 65 Thr Ser Lys Asp Phe Leu Pro Leu Val Ala Lys Gly Ser Lys Ala Gly

DE 198 37 391 A 1

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|----|
| 305 | 310 | 315 | 320 | |
| Met Cys Ala Cys His Ser Pro Leu Pro Ser Ile Arg Gly Val Val Ile | | | | 5 |
| 325 | 330 | 335 | | |
| Val Leu Gly Ala Gly Asp Thr Ala Phe Asp Cys Ala Thr Ser Ala Leu | | | | |
| 340 | 345 | 350 | | 10 |
| Arg Cys Gly Ala Arg Arg Val Phe Ile Val Phe Arg Lys Gly Phe Val | | | | |
| 355 | 360 | 365 | | 15 |
| Asn Ile Arg Ala Val Pro Glu Glu Met Glu Leu Ala Lys Glu Glu Lys | | | | |
| 370 | 375 | 380 | | 20 |
| Cys Glu Phe Leu Pro Phe Leu Ser Pro Arg Lys Val Ile Val Lys Gly | | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 | |
| Gly Arg Ile Val Ala Met Gln Phe Val Arg Thr Glu Gln Asp Glu Thr | | | | 25 |
| 405 | 410 | 415 | | |
| Gly Lys Trp Asn Glu Asp Glu Asp Gln Met Val His Leu Lys Ala Asp | | | | 30 |
| 420 | 425 | 430 | | |
| Val Val Ile Ser Ala Phe Gly Ser Val Leu Ser Asp Pro Lys Val Lys | | | | 35 |
| 435 | 440 | 445 | | |

40

45

50

55

60

65

DE 198 37 391 A 1

Glu Ala Leu Ser Pro Ile Lys Phe Asn Arg Trp Gly Leu Pro Glu Val
 450 455 460
 5 Asp Pro Glu Thr Met Gln Thr Ser Glu Ala Trp Val Phe Ala Gly Gly
 465 470 475 480
 10 Asp Val Val Gly Leu Ala Asn Thr Thr Val Glu Ser Val Asn Asp Gly
 485 490 495
 15 Lys Gln Ala Ser Trp Tyr Ile His Lys Tyr Val Gln Ser Gln Tyr Gly
 500 505 510
 20 Ala Ser Val Ser Ala Lys Pro Glu Leu Pro Leu Phe Tyr Thr Pro Ile
 515 520 525
 Asp Leu Val Asp Ile Ser Val Glu Met Ala Gly Leu Lys Phe Ile Asn
 25 530 535 540
 Pro Phe Gly Leu Ala Ser Ala Thr Pro Ala Thr Ser Thr Ser Met Ile
 30 545 550 555 560
 Arg Arg Ala Phe Glu Ala Gly Trp Gly Phe Ala Leu Thr Lys Thr Phe
 565 570 575
 35 Ser Leu Asp Lys Asp Ile Val Thr Asn Val Ser Pro Arg Ile Ile Arg
 580 585 590
 40 Gly Thr Thr Ser Gly Pro Met Tyr Gly Pro Gly Gln Ser Ser Phe Leu
 595 600 605
 Asn Ile Glu Leu Ile Ser Glu Lys Thr Ala Ala Tyr Trp Cys Gln Ser
 45 610 615 620
 Val Thr Glu Leu Lys Ala Asp Phe Pro Asp Asn Ile Val Ile Ala Ser
 50 625 630 635 640
 Ile Met Cys Ser Tyr Asn Lys Asn Asp Trp Thr Glu Leu Ala Lys Lys
 55 645 650 655
 Ser Glu Asp Ser Gly Ala Asp Ala Leu Glu Leu Asn Leu Ser Cys Pro
 660 665 670
 60 His Gly Met Gly Glu Arg Gly Met Gly Leu Ala Cys Gly Gln Asp Pro
 675 680 685
 65 Glu Leu Val Arg Asn Ile Cys Arg Trp Val Arg Gln Ala Val Gln Ile

DE 198 37 391 A 1

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 690 | 695 | 700 | |
| Pro Phe Phe Ala Lys Leu Thr Pro Asn Val Thr Asp Ile Val Ser Ile | | | 5 |
| 705 | 710 | 715 | 720 |
| Ala Arg Ala Ala Lys Glu Gly Gly Ala Asn Gly Val Thr Ala Thr Asn | | | |
| 725 | 730 | 735 | 10 |
| Thr Val Ser Gly Leu Met Gly Leu Lys Ser Asp Gly Thr Pro Trp Pro | | | |
| 740 | 745 | 750 | 15 |
| Ala Val Gly Ile Ala Lys Arg Thr Thr Tyr Gly Gly Val Ser Gly Thr | | | |
| 755 | 760 | 765 | 20 |
| Ala Ile Arg Pro Ile Ala Leu Arg Ala Val Thr Ser Ile Ala Arg Ala | | | |
| 770 | 775 | 780 | 25 |
| Leu Pro Gly Phe Pro Ile Leu Ala Thr Gly Gly Ile Asp Ser Ala Glu | | | |
| 785 | 790 | 795 | 800 |
| Ser Gly Leu Gln Phe Leu His Ser Gly Ala Ser Val Leu Gln Val Cys | | | 30 |
| 805 | 810 | 815 | |
| Ser Ala Ile Gln Asn Gln Asp Phe Thr Val Ile Glu Asp Tyr Cys Thr | | | |
| 820 | 825 | 830 | 35 |
| Gly Leu Lys Ala Leu Leu Tyr Leu Lys Ser Ile Glu Glu Leu Gln Asp | | | |
| 835 | 840 | 845 | 40 |
| Trp Asp Gly Gln Ser Pro Ala Thr Val Ser His Gln Lys Gly Lys Pro | | | |
| 850 | 855 | 860 | 45 |
| Val Pro Arg Ile Ala Glu Leu Met Asp Lys Lys Leu Pro Ser Phe Gly | | | |
| 865 | 870 | 875 | 880 |
| Pro Tyr Leu Glu Gln Arg Lys Lys Ile Ile Ala Glu Asn Lys Ile Arg | | | 50 |
| 885 | 890 | 895 | |
| Leu Lys Glu Gln Asn Val Ala Phe Ser Pro Leu Lys Arg Ser Cys Phe | | | |
| 900 | 905 | 910 | 55 |
| Ile Pro Lys Arg Pro Ile Pro Thr Ile Lys Asp Val Ile Gly Lys Ala | | | |
| 915 | 920 | 925 | 60 |
| Leu Gln Tyr Leu Gly Thr Phe Gly Glu Leu Ser Asn Val Glu Gln Val | | | |
| 930 | 935 | 940 | 65 |

DE 198 37 391 A 1

Val Ala Met Ile Asp Glu Glu Met Cys Ile Asn Cys Gly Lys Cys Tyr
 945 950 955 960
 5 Met Thr Cys Asn Asp Ser Gly Tyr Gln Ala Ile Gln Phe Asp Pro Glu
 965 970 975
 10 Thr His Leu Pro Thr Ile Thr Asp Thr Cys Thr Gly Cys Thr Leu Cys
 980 985 990
 15 Leu Ser Val Cys Pro Ile Val Asp Cys Ile Lys Met Val Ser Arg Thr
 995 1000 1005
 20 Thr Pro Tyr Glu Pro Lys Arg Gly Val Pro Leu Ser Val Asn Pro Val
 1010 1015 1020
 Cys

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- 35 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

45

(iii) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: CDS

50

(iv) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 3

55

CGCGAATTCT TTTGAAGCTG GATGG 25

60

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(iii) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(iv) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 4

CGCGAATTCT CACCTTAACA CACCGG 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(iii) MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(iv) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 5

AATCAAATAT GGAGCA 16

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 18 Reste
 (B) ART: Aminosäure
 (C) TOPOLOGIE: linear
 10
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 15 (iii) MERKMAL:
 NAME/SCHLÜSSEL:
 LAGE: 52..69
 SEQUENZIERMETHODE:E
 20
 (iv) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 6
 Cys Glu Lys Leu Glu Asn Asn Phe Gly Asp Ile Lys His Thr Thr Leu
 25 52 55 60 65
 Gly Glu
 30 69

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Reste
 (B) ART: Aminosäure
 40 (C) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
 45 (iii) MERKMAL:
 NAME/SCHLÜSSEL:
 LAGE: 660..679
 SEQUENZIERMETHODE:E
 50
 (iv) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 7
 55 Ser Gly Ala Asp Ala Leu Glu Leu Asn Leu Ser Cys Pro His Gly Met
 660 665 670 675
 60 Gly Glu Arg Gly
 679

65 Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper, der Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) spezifisch erkennt.
2. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er humane Dihydropyrimidindehydro-

genase spezifisch erkennt.

3. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er eine starke Reaktivität mit einem Homogenisat der Humantumorzelllinie HT-3 (ATCC HTB-32), aber eine geringe oder keine Reaktivität mit einem Homogenisat der Humantumorzelllinie MCF-7 (ATCC HTB-22) zeigt.
4. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Immunpräzipitat, das mit einem Homogenisat der Humantumorzelllinie HT-3 (ATCC HTB-32) erhalten wird, eine einzige Bande zeigt, wenn mit SDS-PAGE analysiert wird.
5. Monoklonaler Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 4, der mit einer Hybridomazelllinie erzeugt werden kann, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Hybridomazelllinien 2B6-11-1, 9C7-30-1, 5E6-19-1, 3A5-6-1 (FERM BP-6015), 6H5-42-1, 4B9-12-1 (FERM BP-6016), 2E2-B3-1-3 (FERM BP-6014) und 3B12-B1-56-1-2.
6. Monoklonaler Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er an DPD in äquivalenter Weise bindet, wie ein monoklonaler Antikörper nach Anspruch 5.
7. Hybridomazelllinie, die einen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 erzeugt.
8. Hybridomazelllinie nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Hybridomazelllinien 2B6-11-1, 9C7-30-1, 5E6-19-1, 3A5-6-1, 6H5-42-1, 4B9-12-1, 2E2-B3-1-3 und 3B12-B1-56-1-2.
9. Paar monoklonaler Antikörper umfassend einen ersten monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und einen zweiten monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der erste monoklonale Antikörper und der zweite monoklonale Antikörper verschiedene Epitope erkennen.
10. Paar nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der erste monoklonale Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mab-3A5-6-1, Mab-6H5-42-1 und Mab-3B12-B1-56-1-2, und der zweite Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Mab-4B9-12-1, Mab-2E2-B3-1-3, Mab-9C7-30-1, Mab-2B6-11-1 und Mab-5E6-19-1.
11. Paar nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der erste monoklonale Antikörper Mab-3A5-6-1 ist und der zweite monoklonale Antikörper Mab-4B9-12-1 ist.
12. Paar nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der erste monoklonale Antikörper Mab-3A5-6-1 ist und der zweite Antikörper Mab-2E2-B3-1-3 ist.
13. Kit zum Nachweis und/oder zur Bestimmung der Menge von Dihydropyrimidindehydrogenase in einer biologischen Probe, der
 - (a) mindestens einen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und
 - (b) eine Markierung zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis des Immunkonjugats aus monoklonalem Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase umfaßt.
14. Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Paar monoklonaler Antikörper nach einem der Ansprüche 9 bis 11 und eine Markierung zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis des Immunkonjugats aus monoklonalem Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase umfaßt.
15. Verwendung eines Kits nach Anspruch 13 oder Anspruch 14 zum Nachweis und/oder zur Bestimmung der Menge von Dihydropyrimidindehydrogenase in einer biologischen Probe.
16. Immunoassay zum Nachweis und/oder zur Bestimmung der Menge von Dihydropyrimidindehydrogenase in einer biologischen Probe, der umfaßt, daß man
 - (a) die Probe mit mindestens einem monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6 behandelt, um ein Immunkonjugat von Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase herzustellen und
 - (b) das Immunkonjugat mit Hilfe einer Markierung qualitativ oder quantitativ nachweist.
17. Assay nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Immunpräzipitationsassay ist.
18. Assay nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist.
19. Verfahren zur Bestimmung eines DPD-Mangelzustandes bei einem Patienten, das umfaßt, daß man
 - (a) eine biologische Probe des Patienten mit einem monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 2 bis 6 behandelt und
 - (b) das Immunkonjugat aus monoklonalem Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase quantitativ nachweist.
20. Verfahren zur Abschätzung der Empfindlichkeit von Patienten, die unter Krebs leiden, für eine Behandlung mit Antitumormitteln der Reihe der 5-Fluoruracil(5-FU)-Derivate, das umfaßt, daß man
 - (a) eine biologische Probe des Patienten mit einem monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 2 bis 6 behandelt und
 - (b) das Immunkonjugat aus monoklonalem Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase quantitativ nachweist, um den Gehalt an Dihydropyrimidindehydrogenase in der biologischen Probe des Patienten zu bestimmen, um ein Maß der Empfindlichkeit zu erhalten.
21. Verfahren, um die Empfindlichkeit von Patienten, die unter Krebs leiden, für eine Behandlung mit Antitumormitteln der Reihe der 5-Fluoruracil(5-FU)-Derivate abzuschätzen, das umfaßt, daß man
 - (a) eine biologische Probe des Patienten mit einem monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 2 bis 6 behandelt,
 - (b) das Immunkonjugat aus monoklonalem Antikörper und Dihydropyrimidindehydrogenase quantitativ nachweist, um den Gehalt an Dihydropyrimidindehydrogenase in der biologischen Probe des Patienten zu bestimmen,
 - (c) den Gehalt an Pyrimidinnucleosidphosphorylase in der biologischen Probe des Patienten bestimmt und
 - (d) das Verhältnis des Gehalts von Pyrimidinnucleosidphosphorylase und des Gehalts von Dihydropyrimidin-

DE 198 37 391 A 1

dehydrogenase berechnet, um ein Maß für die Empfindlichkeit zu erhalten.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cc

Fig.1

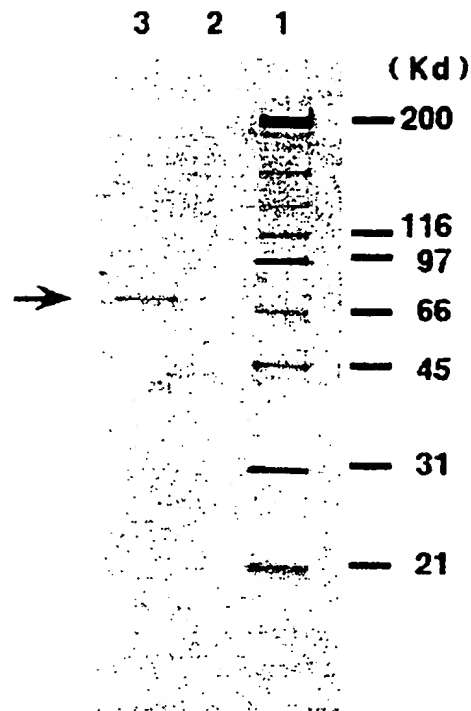
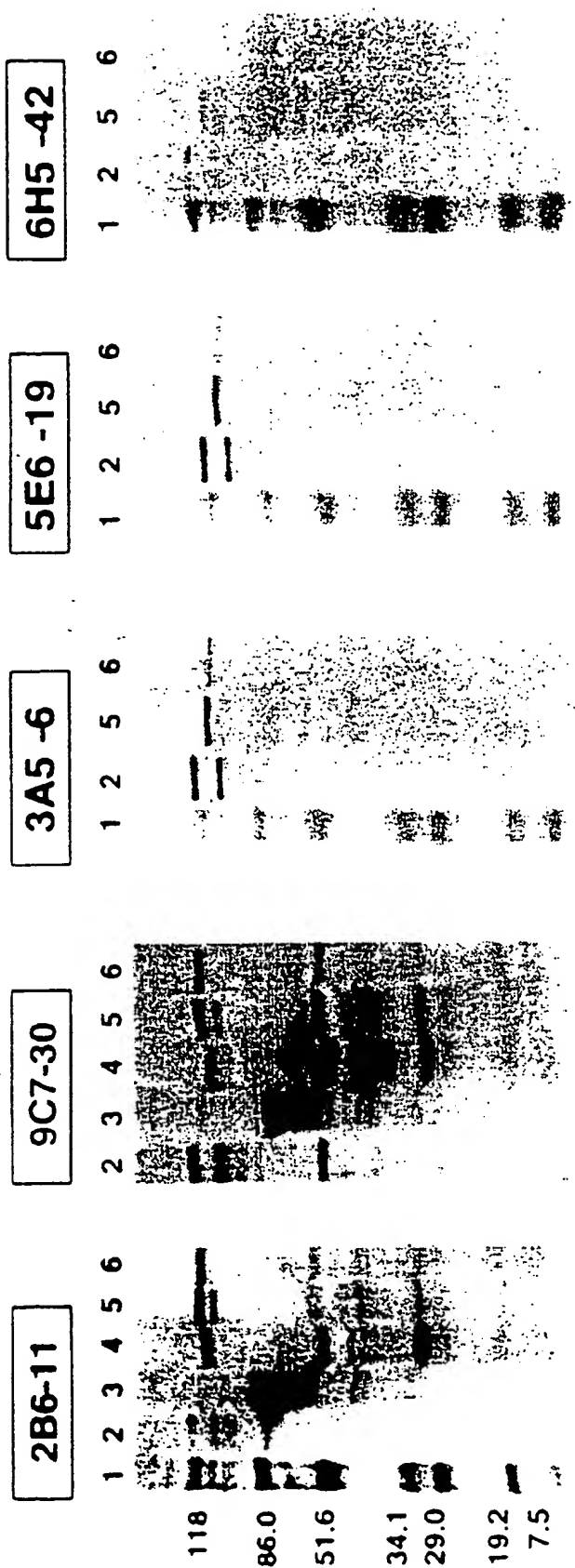


Fig.2



1. Marker
2. reDPD
3. HT-3 Xenotransplantat-Homogenisat
4. Humanlungenkarzinom-Homogenisat
5. Humanlungenkarzinom-Homogenisat
6. Humanlungenkarzinom-Homogenisat

Fig.3

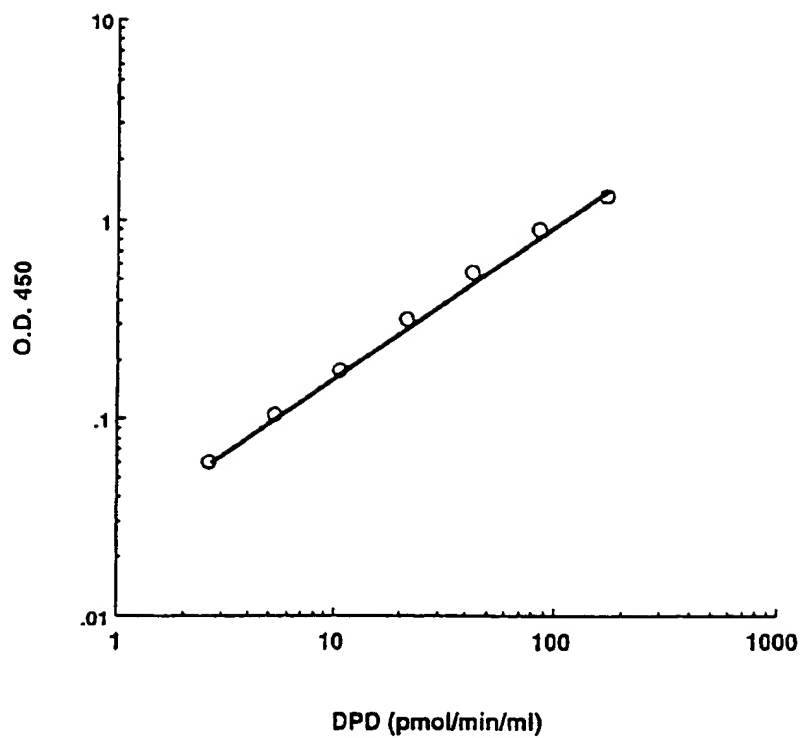


Fig.4

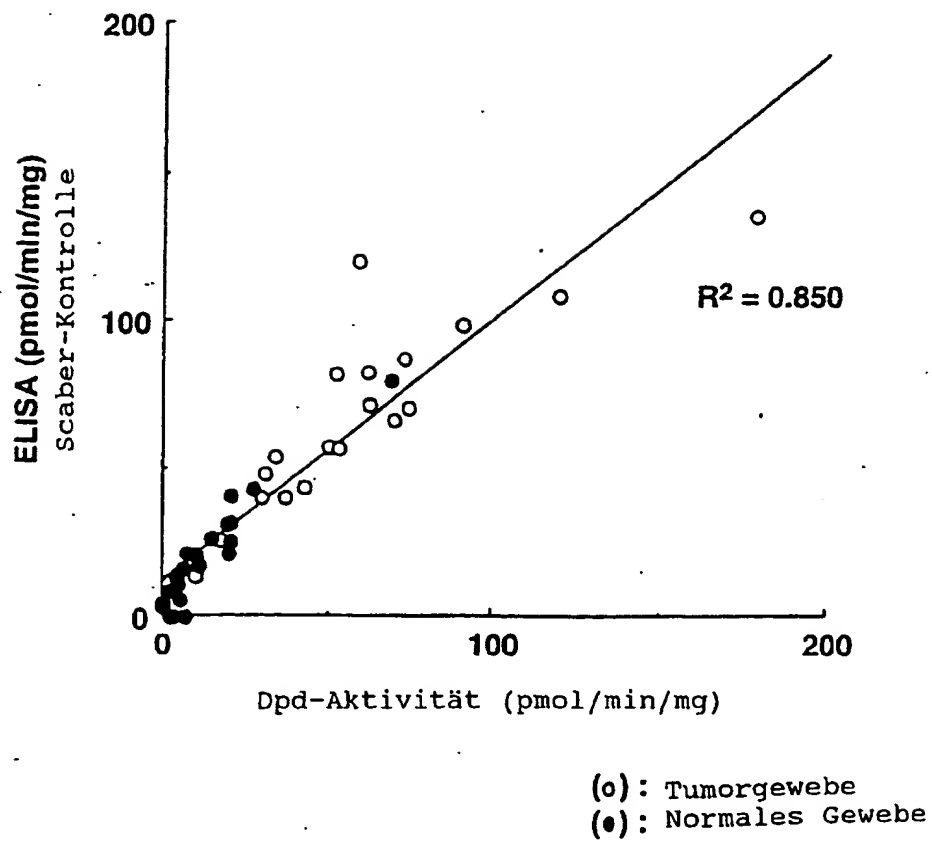
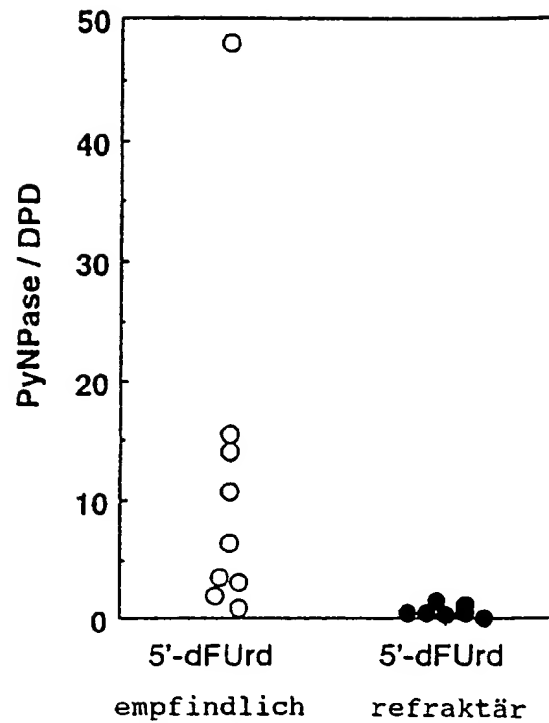


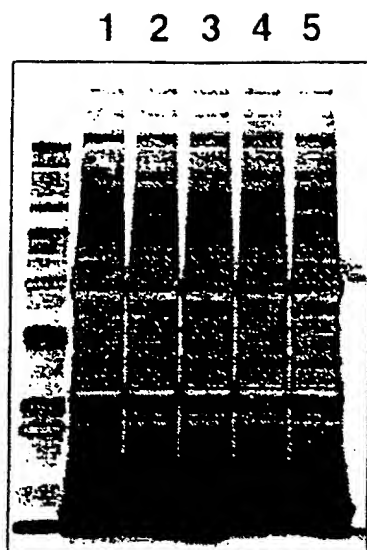
Fig.5



- | | |
|-----------|--------------|
| ○ Scaber | ● SK-OV-3 |
| ○ ZR-75-1 | ● MDA-MB-231 |
| ○ MCF-7 | ● HT-29 |
| ○ LoVo | ● T-24 |
| ○ MKN45 | ● WIDr |
| ○ SIHA | ● MKN28 |
| ○ ME-180 | ● PC-3 |
| ○ HCT116 | |
| ○ COLO205 | |

Fig.6-1

(a)



(b)

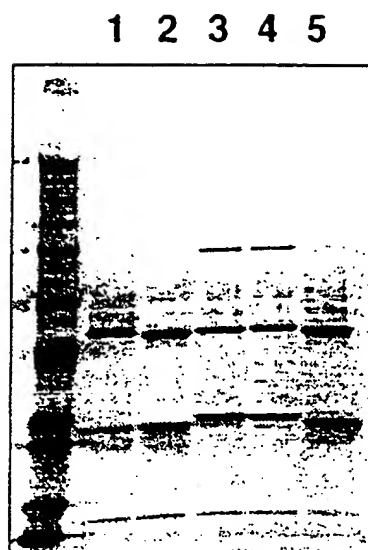
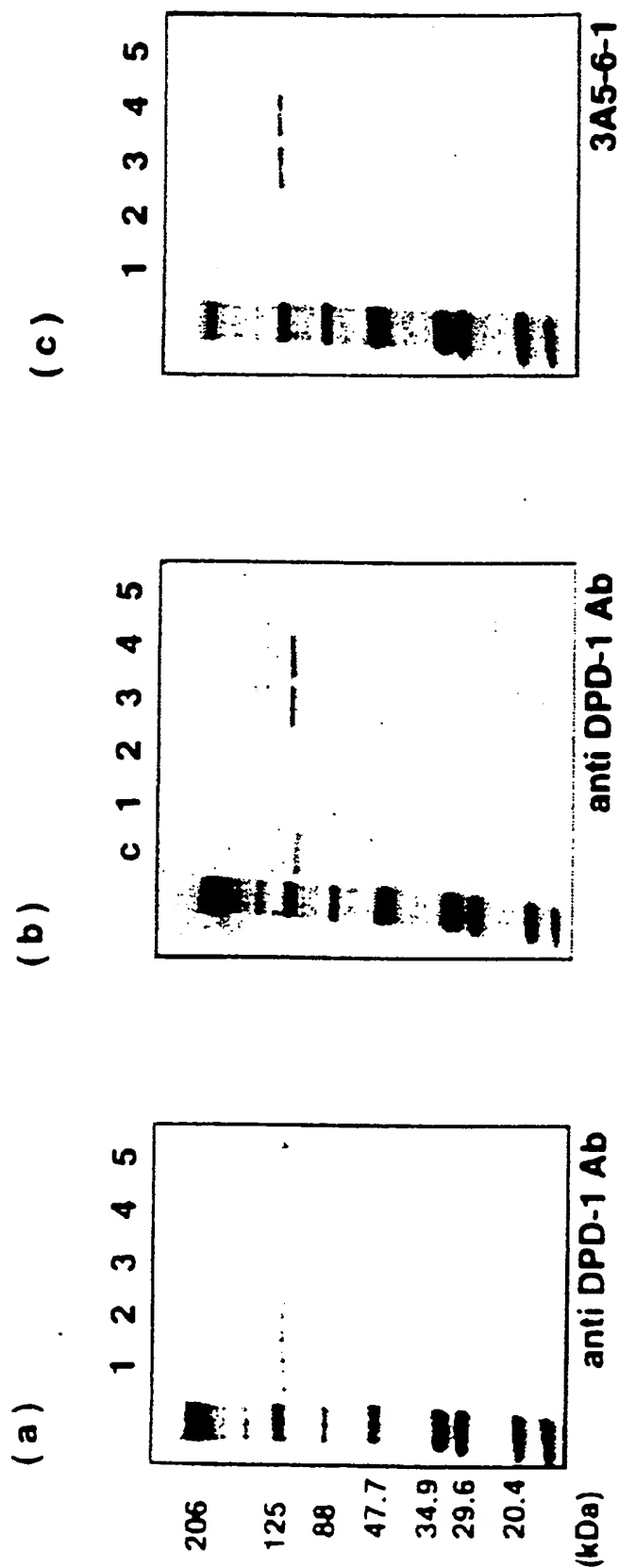


Fig.6-2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.